

# ANNALES

## DE

# L'INSTITUT PASTEUR

### CULTURE DES BACILLES TUBERCULEUX DANS DU JAUNE D'ŒUF

par A. BESREDKA.

Il nous est revenu de différents côtés que la préparation du milieu à l'œuf (1) rencontre des difficultés de nature à en empêcher l'usage courant. Nous avons cherché à simplifier la technique. Le milieu que nous proposons aujourd'hui est purgé de blanc d'œuf. Il est composé uniquement de jaune d'œuf et d'eau distillée. A l'encontre de l'ancien milieu, il se prête à la stérilisation à l'autoclave. Sa préparation est simple : on bat le jaune d'œuf dans de l'eau et on alcalinise le mélange. La préparation est rapide : en quelques minutes on peut faire une large provision.

Le milieu en question a fait ses preuves : c'est à lui que nous nous adressons pour préparer l'antigène tuberculeux ; c'est encore de lui que nous nous servons quand nous avons besoin de la tuberculine, aussi pure possible, pour nos expériences.

Prenons vingt œufs. Réunissons leurs jaunes (350 cent. cubes) dans un grand verre à pied et ajoutons un litre d'eau distillée. L'eau doit être pure et avoir une réaction neutre ; dans le cas où elle serait acide, on commence par la neutraliser.

(1) Ces *Annales*, 1913, p. 1009 ; 1914, p. 576 ; *C. R. Acad. Sciences*, 156, p. 1632, 1913.

Reste à clarifier l'émulsion au moyen d'une solution de soude à 1 p. 100. Ce temps est le plus délicat de la préparation : l'excès de soude rend le milieu impropre à la culture, le défaut de soude nuit à la transparence du milieu.

On évite ces écueils en versant d'abord une quantité de soude égale à la moitié de la quantité de jaunes réunis ; ainsi, à 350 cent. cubes de jaune on ajoute — par petites portions — 175 cent. cubes de solution de soude à 1 p. 100. On s'arrête un moment pour s'assurer du degré de la solubilisation ainsi réalisée ; puis, on procède à de petites additions de 1 à 1 cent. cube 5 de soude, en aspirant chaque fois le jaune dans une pipette. On suit de la sorte la clarification ; celle-ci est arrivée au point optimum lorsque le liquide apparaît transparent en couche mince, dans la pipette par exemple, et qu'il reste légèrement opaque en couche épaisse, vu à travers les parois du verre à pied. Une dizaine de centimètres cubes ajoutés à 175 cent. cubes précédemment versés y suffisent généralement.

Avec de l'eau distillée on complète jusqu'à obtenir — dans le cas particulier — sept litres de liquide, dans lequel le jaune est représenté dans la proportion de 1 : 20 ( $350 : 7.000 = 1 : 20$ ). Le milieu est réparti en boîtes de Roux (50 à 150 cent. cubes) et stérilisé à 110° pendant vingt minutes.

Il est bon d'être prévenu que la quantité de soude nécessaire pour dissoudre le jaune d'œuf n'est pas toujours la même ; ainsi, nous avons rencontré des jaunes dont la dissolution demandait presque deux fois moins de soude que la quantité que nous venons d'indiquer.

Dans ce milieu qui ne renferme que le jaune d'œuf dissous, auquel il n'est ajouté *ni macération de viande, ni peptone, ni sel, ni glycérine*, les bacilles tuberculeux poussent en profondeur, sous forme de filaments blancs, extrêmement ténus.

Pour avoir des cultures riches, il y a lieu de procéder à de largesensemencements. Dès le lendemain, on se rend compte, par une simple inspection, que la culture est en marche. De jour en jour sa richesse augmente.

Au quatrième jour, elle est assez abondante pour qu'elle puisse servir à la préparation de l'antigène en vue des réactions de fixation (1).

Vers le quinzième jour, tout le fond de la boîte de Roux se trouve tapissé d'un fin voile blanc que la moindre secousse brise et transforme en une poussière extrêmement fine. Les bacilles continuent à se développer pendant deux mois environ.

Quel que soit l'âge de la culture, il ne s'en dégage jamais cette odeur pénétrante, bien connue, que l'on rattache à la présence de la tuberculine.

(1) La préparation d'antigène est d'une grande simplicité, celui-ci n'étant autre chose qu'une culture âgée de quatre jours, stérilisée et rendue homogène par agitation. L'émulsion-mère conserve indéfiniment ses propriétés.

Dans du jaune d'œuf, les cultures, tout en restant inodores, n'en renferment pas moins de la tuberculine. Ainsi une culture de trois semaines, stérilisée et débarrassée de bacilles, tue le cobaye tuberculeux à la dose de 1,5-2 cent. cubes en moins de vingt-quatre heures ; une culture âgée de trente-cinq jours tue, dans des conditions analogues, à la dose de 1 cent. cube ; dans les cultures plus âgées (cinquante jours), la tuberculine tue à la dose de 0 c. c. 5 et rend malade le cobaye tuberculeux à celle de 0 c. c. 25 injectée dans le péritoine.

Nous nous réservons d'y revenir ; notons dès aujourd'hui que dans le milieu à l'œuf le rendement en tuberculine est comparable à celui dans du bouillon glycéринé ; de plus, la préparation de la tuberculine dans ce milieu est simple et exige peu de frais.



## DE LA SPÉCIFICITÉ DE L'ANTIGÈNE TUBERCULEUX DE BESREDKA

par A. URBAIN et B. FRIED.

Il ressort de nombreuses observations faites tant sur l'homme que sur les bovidés que la réaction de fixation au moyen de l'antigène à l'œuf est généralement en plein accord avec la clinique.

Chez les tuberculeux, pulmonaires ou autres, la réaction de fixation est positive dans 90-95 p. 100 des cas; chez les non-tuberculeux, c'est-à-dire chez les sujets normaux ou atteints d'affections autres que la tuberculose, le pourcentage des résultats positifs est nul ou insignifiant.

Dès ses premières recherches, Besredka avait observé que seuls les sérums des syphilitiques offraient une exception à la règle, à savoir que l'antigène tuberculeux fixait souvent l'alexine en présence des sérums syphilitiques. Les recherches plus récentes ont montré que cette fixation prend effectivement place dans 30-35 p. 100 des sujets syphilitiques.

Rappelons qu'un certain nombre de savants [Massol (1), Rogers (2), Boquet et Nègre (3)] ont observé des cas de fixation non spécifiques, notamment en présence d'anticorps tuberculeux. Ainsi, ces auteurs ont trouvé qu'une émulsion des bacilles (diphthériques, *subtilis*, coli) ou l'extrait alcoolique (bacille diphthérique, cryptocoque) pouvaient faire office d'antigène tuberculeux, c'est-à-dire fixer l'alexine, en présence des sérums renfermant des anticorps tuberculeux.

Désirant nous rendre compte du degré de spécificité de l'anti-

(1) Cité par Calmette, L'infection bacillaire et la tuberculose, p. 460, Masson, 1920.

(2) Complement fixation in tuberculosis and a comparison of the Wassermann et Hecht-Weinberg-Gradwohl systems. *The Journal of infectious diseases*, août 1920, 2, p. 401.

(3) Valeur antigène comparative des extraits alcooliques de bacilles tuberculeux et de microbes divers. *Soc. de Biol.*, 26 juin 1920.

gène à l'œuf, nous avons entrepris plusieurs séries d'expériences dont l'exposé suit :

A. — Antigènes variés non tuberculeux. Sérums tuberculeux.

Comme antigènes nous avons employé les émulsions de divers microbes :

Streptocoques (2 d'origine humaine, 1 d'origine équine).  
Staphylocoques (3 d'origine humaine, 1 de mammité de brebis).  
Pneumocoque II.  
Bacterium coli.  
Paracoli équin.  
Bacille d'Eberth.  
Paratyphique B.  
Bacille de la morve.  
Bactéridie charbonneuse.  
B. subtilis.  
Bacille diphtérique.

Avec ces différents microbes, il a été préparé des émulsions qui nous ont servi d'antigènes, à raison de 1 centigramme de corps microbiens pour 20 cent. cubes d'eau physiologique [procédé de Nicolle-Fraser-Debains-Nicolas (1)]. A ce taux, les émulsions fixent toujours les anticorps contenus dans les sérums correspondants. (Seuls les sérums antidiphtérique et anticharbonneux ne renferment pas d'anticorps susceptibles de dévier l'alexine en présence du bacille diphtérique et de la bactéridie).

Comme source d'anticorps, nous nous sommes adressés, d'une part, à un sérum d'un cheval immunisé avec des bacilles tuberculeux et très riche en anticorps (plus de 5.000 unités), et d'autre part, à de nombreux sérums humains provenant de sujets tuberculeux ayant donné une très forte réaction de fixation avec l'antigène à l'œuf.

En ce qui concerne la technique, nous avons suivi celle qui consiste dans l'emploi d'une dose constante d'antigène et de sérum, et de quantités variables d'alexine. Nous avons adopté, en outre, la méthode de Calmette et Massol (2) pour la numération des unités d'anticorps : si un volume  $v$  du sérum étudié

(1) Recherche sur la préparation des sérums antimicrobiens et antitoxiques chez le cheval. Ces *Annales*, mai 1920.

(2) CALMETTE et MASSOL. *Soc. de Biol.*, 6 janvier 1912.

dévie N doses minima de complément, le rapport  $\frac{N}{v}$  représente le nombre de doses minima de complément que peut dévier 1 cent. cube du sérum. L'unité d'anticorps correspond à la quantité de sensibilisatrice capable de dévier une dose minima d'alexine.

Les résultats obtenus avec le sérum du cheval antituberculeux et avec les sérums des chevaux normaux sont exprimés en unités d'anticorps dans le tableau suivant :

Antigènes employés	Sérum du cheval antituberculeux	Sérum des chevaux normaux
—	—	—
Streptocoque . . . . .	0 unité.	0 unité.
Staphylocoque . . . . .	—	—
Méningocoque . . . . .	—	—
Pneumocoque . . . . .	—	—
Bacterium coli . . . . .	—	—
Bacille d'Eberth . . . . .	—	—
Paratyphique B. . . . .	—	—
Paracoli bacille équin . . . . .	—	—
Bacille de la morve . . . . .	—	—
Bactérie charbonneuse . . . . .	—	—
Subtilis . . . . .	—	—
Bacille diphtérique (plusieurs origines)	250 unités d'anticorps.	—

Avec les sérums humains tuberculeux, les résultats sont sensiblement comparables, sauf avec le bacille diphtérique où, seulement dans 3 cas sur 20, une fixation a été constatée, et avec le *subtilis* en présence duquel 2 sérums sur 15 examinés ont fixé le complément.

Comme on le voit, sauf des cas très rares, les antigènes non spécifiques, c'est-à-dire non tuberculeux, laissent l'alexine intacte en présence de sérums riches en anticorps tuberculeux.

#### B. — Antigène tuberculeux à l'œuf.

##### Sérums variés, non tuberculeux.

Dans cette série d'expériences, nous nous sommes servis de l'antigène de Besredka, d'une part, et, d'autre part, de différents sérums thérapeutiques, antimicrobiens et antitoxiques, de l'Institut Pasteur.

Le tableau ci-après résume, en unités d'anticorps, les résultats obtenus comparativement avec le sérum de cheval immunisé au moyen de bacilles tuberculeux.



Sérums employés	Fixation	Unités en anticorps
Sérum de cheval antituberculeux .	Fortement positive.	5.000 unités.
— antidysentérique . . . . .	Pas de fixation.	0 —
— antipesteux . . . . .	—	0 —
— antiméningococcique . . . . .	—	0 —
— anticharbonneux . . . . .	—	0 —
— antitétanique . . . . .	—	0 —
— antipneumococcique . . . . .	Fixation très légère.	25 —
— antistreptococcique . . . . .	—	50 —
— antidiphthérique . . . . .	Fixation positive.	500 —
— normal (10 chevaux) . . . . .	Pas de fixation.	0 —

Ici également, sauf pour la diphtérie, la réaction de fixation au moyen de l'antigène à l'œuf est restée négative avec des sérums non tuberculeux.

### C. — Sérums humains.

Pour compléter ces recherches, nous nous sommes demandé comment se comportait l'antigène de Besredka au contact de sérums des sujets atteints de maladies autres que la tuberculose. Il a été examiné en tout 60 sérums (1).

a) MALADIES MICROBIENNES. — Fièvre typhoïde à la période de convalescence, 4 cas; réaction de fixation négative.

Erysipèle (16 cas) dont 6 à forme grave, en pleine évolution avec fièvre 39-40°, 9 en convalescence de deux semaines à deux mois. Parmi les convalescents, 4 avaient des érysipèles pour la troisième et quatrième fois, 1 pour la vingt-troisième fois. Chez tous ces malades la réaction fut négative.

Ostéomyélite (2 cas): réaction de fixation négative.

En présence des résultats signalés plus haut au sujet du sérum antidiphthérique, il nous a paru particulièrement intéressant de rechercher la réaction de fixation chez les malades atteints de diphtérie.

Sur 21 sérums diphtériques (17 enfants, 4 adultes) dont les uns récemment malades (2-3 jours) et les autres convalescents, la réaction fut positive dans 5 cas (4 enfants et 1 adulte).

Cette proportion assez élevée de réactions positives nous a

(1) Nous devons ces sérums à l'extrême obligeance de MM. Auclair, Boidin, Lereboullet et Lwoff.

d'abord surpris; mais une enquête rapide ne tarda pas à nous en expliquer la cause. Chez 4 malades, dont le sérum donna une réaction positive, le sang avait été prélevé dans les trois à douze jours qui ont suivi les injections de doses massives de sérum antidiphthérique. Dans un seul cas, très grave avec paralysie, la dernière injection du sérum précédait la prise du sang de vingt-trois jours.

Il est évident que la fixation positive observée chez les diphthériques devait être attribuée surtout à la présence dans la circulation du sérum antidiphthérique, lequel, comme nous l'avons noté plus haut, possède la propriété de fixer l'alexine en présence de l'antigène tuberculeux.

b) MALADIES NON MICROBIENNES. — Néphrite chronique, débilité mentale, hémiplegie, délire de négation, dépression mélancolique, alcoolisme, cancer de l'estomac, papillome, fibrome et sarcome (21 cas).

Dans tous ces cas, la réaction de fixation avec l'antigène de Besredka fut négative.

### Conclusions.

1° Le sérum antituberculeux de cheval fixe au contact de l'antigène tuberculeux à l'œuf une très grande quantité d'alexine (plus de cinq mille doses). Ce même sérum, mis en présence d'autres antigènes (streptocoques, staphylocoques, pneumocoque, coli-bacille, paracoli équin, bacille d'Eberth, bacille paratyphique B, bacille de la morve, bactériidie charbonneuse, *B. subtilis*) se comporte comme un sérum normal, c'est-à-dire ne fixe pas l'alexine.

2° Les sérums des malades tuberculeux, qui fixent fortement l'alexine en présence de l'antigène tuberculeux, restent indifférents en présence des antigènes non spécifiques énumérés plus haut. Dans 3 cas seulement (sur 20 sérums) il a été noté une réaction positive en présence de l'antigène diphthérique et dans deux cas (sur 15 sérums) en présence de l'antigène fait avec le *subtilis*.

3° Les sérums des chevaux immunisés contre divers microbes et toxines, mis en présence de l'antigène tuberculeux, ne



donnent pas lieu à une réaction de fixation appréciable ; ils se comportent, en général, comme les sérums des chevaux normaux, non préparés. Seul le sérum antidiphthérique de cheval est doué d'un pouvoir fixateur notable, très inférieur cependant à celui qui est propre au sérum de cheval préparé avec des bacilles tuberculeux.

4° Les sérums des malades atteints de maladies autres que la tuberculose (fièvre typhoïde, érysipèle, néphrite, etc.) ne donnent lieu à aucune fixation en présence de l'antigène tuberculeux. Seuls les sérums des diphthériques semblent de prime abord faire une exception à la règle ; en réalité, il s'agit toujours dans ces cas de malades qui avaient reçu du sérum antidiphthérique quelques jours avant l'examen du sang.

(Institut Pasteur et Laboratoire militaire de recherches vétérinaires.)

**RECHERCHES SUR LA VALEUR ANTIGÈNE  
DES ÉMULSIONS BACILLAIRES  
ET DES EXTRAITS ÉTHYLIQUES ET MÉTHYLIQUES  
DE BACILLES TUBERCULEUX**

par L. NÈGRE et A. BOQUET.

La recherche des anticorps, dans le sérum des tuberculeux, a une importance telle, au double point de vue diagnostique et pronostique, qu'un grand nombre d'expérimentateurs se sont efforcés d'en préciser la technique et d'en perfectionner les moyens.

C'est ainsi que les antigènes les plus variés ont été successivement employés : émulsions bacillaires, tuberculines, extraits aqueux, glycéринés, peptonés, sodiques, éthérés ou alcooliques de bacilles. Parmi toutes ces préparations, l'extrait peptoné B<sub>2</sub> de Calmette et Massol et l'antigène à l'œuf de Besredka se sont montrés les plus actifs. Mais l'antigène B<sub>2</sub> ne peut être obtenu qu'au moyen d'une peptone riche en albumoses : la peptone de Witte dont il est difficile de se procurer des échantillons de composition toujours identique, et les autres peptones ne donnent pas les mêmes résultats. L'antigène à l'œuf présente l'inconvénient de ne pouvoir être conservé que pendant un très court délai.

Les extraits alcooliques de bacilles tuberculeux, qui ont l'avantage de se conserver indéfiniment, ont été préconisés par divers auteurs, en particulier par Petroff; ils ont été délaissés à cause de leur sensibilité insuffisante (extraits éthyliques) ou excessive (extraits méthyliques). Cette défectuosité paraît résulter de la technique suivie. Nous inspirant de divers travaux sur les antigènes syphilitiques, nous avons préparé un antigène spécifique très actif, d'un emploi facile, qui permet de déceler et de titrer les anticorps tuberculeux, aussi bien dans le sérum des animaux traités que dans le sérum des malades.

\*  
\* \*

Les essais de titrages qui sont exposés dans ce mémoire ont été effectués, suivant la technique de Calmette et Massol, en faisant décroître les doses d'antigène, en présence d'une dose fixe d'alexine au dixième. Nous nous sommes servis, dans toutes nos expériences, soit d'un sérum de cheval antituberculeux riche en sensibilisatrice, mis aimablement à notre disposition par M. Vallée, soit d'un sérum également très actif d'un cheval traité par des injections intraveineuses de bacilles biliés.

Le tableau ci-joint montre le dispositif général de la réaction.

Alexine au 1/10 active à 0,05	Antigène au 1/10	Sérum
0,3	0,1	0,5
»	0,2	»
»	0,3	»
»	0,4	»
»	0,5	»
»	0,6	»
»	0,7	»
»	0,8	»
»	0,9	»
0,05	0,9	
0,1	0,9	
0,05		0,5
0,1		0,5

Le volume total du liquide étant ramené à 3 cent. cubes dans chaque tube, les mélanges antigène, anticorps et alexine, et les tubes témoins, sont placés à l'étuve à 37° pendant une heure. On ajoute ensuite le système hémolytique : 1 goutte de globules de mouton lavés et 20 doses minima de sensibilisatrice hémolytique. Les tubes sont, de nouveau, laissés pendant une heure à l'étuve ; puis on lit les résultats.

La valeur de l'antigène est exprimée en nombre d'unités d'alexine, d'après le rapport

$$\frac{N}{V} = \frac{\text{nombre de doses minima d'alexine}}{\text{volume d'antigène}}.$$

Cette valeur, d'après Calmette et Massol, peut encore être établie en faisant croître les doses d'alexine en présence d'une dose fixe d'antigène et de sérum antituberculeux. Nous avons



employé les deux méthodes qui fournissent des renseignements comparables.

### Émulsions de bacilles biliés.

Les bacilles tuberculeux, humides ou desséchés, employés comme antigène, ont toujours donné des résultats inconstants, à cause de l'impossibilité de préparer des émulsions parfaitement homogènes. De plus, leur pouvoir anticomplémentaire est souvent assez élevé. MM. Calmette et Guérin ont réussi à obtenir, par culture sur pomme de terre biliée, des bacilles qui jouissent de propriétés très spéciales et, en particulier, s'émulsionnent avec la plus grande facilité.

Nous avons recherché quelle pouvait être la valeur antigène de ces microbes mis en suspension dans l'eau physiologique, en opérant comme il suit : les bacilles d'une culture de trois semaines, sur pomme de terre biliée, sont récoltés à la spatule, pesés et dissociés soit au mortier avec II ou III gouttes de bile de bœuf stérile, soit dans un flacon contenant des billes de verre. On ajoute ensuite goutte à goutte l'eau physiologique en agitant constamment, puis on stérilise par chauffage pendant une heure à 80°.

Ces émulsions de bacilles biliés sont très homogènes et très stables. Leurs propriétés antigènes se conservent intactes pendant deux à trois semaines. Il suffit, avant chaque expérience, de bien agiter le liquide afin de remettre en suspension le dépôt bacillaire accumulé au fond et sur les parois des tubes.

### TITRAGE ET ACTIVITÉ COMPARÉE DES ÉMULSIONS BACILLAIRES.

Les résultats des titrages suivants, qui représentent la moyenne d'un grand nombre d'essais, sont exprimés en nombre de doses maxima d'alexine au dixième, fixées en présence de quantités constantes d'antigène et de sérum de Vallée.

	Doses minima d'alexine
Emulsion de corps bacillaires desséchés (1 milligr. par cent. cube).	3
— de bacilles biliés . . . . .	18
— de bacilles humains frais . . . . .	8

Ces chiffres démontrent que les corps bacillaires desséchés, qui s'émulsionnent mal, n'étant pas mouillés par l'eau physiologique, fournissent un antigène médiocre. Les bacilles humains ou bovins frais, émulsionnés dans quelques gouttes de bile, puis dilués dans l'eau physiologique, leur sont préférables, quoique très inférieurs aux bacilles biliés.

Pour la recherche des anticorps, les émulsions de ces derniers bacilles doivent être employées à la dose de 0 c. c. 5 et au titre de 1 milligr. de corps bacillaires par centimètre cube. A cette dose, elles ne sont pas hémolytiques et n'ont aucun pouvoir anticomplémentaire.

### Extraits bacillaires à l'alcool éthylique.

L'instabilité des émulsions bacillaires, la courte durée de leur conservation et leur faible activité, surtout en présence de sérums de malades, ont incité de nombreux expérimentateurs à rechercher de nouveaux antigènes d'un emploi facile et d'une plus grande sensibilité.

Kurt Meyer a été ainsi conduit à étudier les propriétés antigènes des divers extraits obtenus en faisant agir, sur les bacilles tuberculeux, un des solvants suivants : alcool, benzine, acétone, éther et éthylène trichloré. Il a constaté que les parties insolubles dans l'acétone et solubles dans l'alcool, composées de phosphatides principalement, possèdent le pouvoir fixateur le plus élevé; et il attribua à ces phosphatides les propriétés fixatrices des bacilles tuberculeux. Les graisses, les acides gras et les cires seraient sans action, comme l'avait déjà montré Calmette.

Dans les essais de préparation d'un extrait alcoolique de bacilles tuberculeux, nous nous sommes inspirés de la technique générale indiquée par Noguchi d'abord, puis par Bordet et Ruelens, pour l'obtention d'un antigène syphilitique, et nous avons opéré ainsi qu'il suit : les bacilles tuberculeux stérilisés par le chauffage pendant une heure à 120°, lavés et desséchés à l'étuve ou sous la cloche à vide, sont mis en contact, à la température du laboratoire, avec de l'acétone à raison de 1 centigramme de corps bacillaires par centimètre cube de liquide; vingt-quatre à trente-six heures après, le mélange est

filtré sur papier, et les bacilles de nouveau desséchés à l'étuve sont traités par l'alcool à 96°, dans les mêmes proportions que précédemment. L'émulsion est fréquemment agitée. Après quarante-huit heures de contact, les microbes sont séparés par filtration. L'extrait alcoolique ainsi débarrassé des corps bacillaires constitue l'antigène tuberculeux. Dilué au dixième et employé à la dose de 4 cent. cube, cet antigène présente un pouvoir anticomplémentaire pour une dose minima active d'alexine. Pour une dilution au cinquième, ce pouvoir empêchant s'exerce avec deux doses minima d'alexine.

Les extraits alcooliques ainsi préparés sont parfaitement clairs ; ils ne donnent aucun précipité par addition d'eau. Leur limpidité n'est pas altérée par le vieillissement et leur conservation à l'abri de la lumière paraît indéfinie.

Evaporés au bain-marie, ils laissent un dépôt blanc grisâtre, insoluble dans l'eau physiologique, où ils forment, après agitation, une émulsion grossière dont le pouvoir antigène est presque nul. Repris par l'alcool à 96°, le dépôt s'y redissout complètement et récupère son activité primitive.

Les extraits alcooliques de bacilles tuberculeux contiennent, d'après les auteurs, une fraction des graisses et des cires qui ont échappé à l'action dissolvante de l'acétone, et des lipoides, en particulier, des phosphatides. Traités pendant vingt-quatre heures par l'éther de pétrole, qu'on sépare ensuite par filtration, ils perdent les deux tiers de leur pouvoir antigène. Leur activité, dans la réaction de déviation du complément, paraît donc bien être fonction de leur teneur en lipoides.

#### INFLUENCE DU TRAITEMENT PRÉALABLE PAR L'ACÉTONE.

Les extraits acétoniques sont complètement inactifs dans la réaction de déviation du complément ; nos essais confirment sur ce point les expériences de Kurt Meyer. D'autre part, leur pouvoir anticomplémentaire est nul, et, ajoutés aux extraits alcooliques à des doses variables, ils n'augmentent pas leur action empêchante sur l'alexine. Le rôle de l'acétone paraît donc consister dans une simple dissolution des produits bacillaires qui contrarient l'action extractive de l'alcool, au cours du traitement direct par ce réactif. Les produits ainsi dissous par



l'acétone consisteraient, d'après les recherches d'Agulhon et Frouin, en un mélange de matières grasses neutres, et d'acides gras libres.

Le tableau ci-après montre l'influence du traitement acétonique préalable dans l'extraction des substances antigènes par l'alcool.

		Valeur exprimée en unités d'alexine en présence de sérum de Vallée (dose : 0,5)	
Extrait acétonique . . . . .		0	unité.
—	alcoolique direct . . . . .	160	—
—	— à l'appareil de Kumagawa. . . . .	400	—
—	obtenu par le mélange acétone-alcool . . . . .	250	—
—	alcoolique après traitement acétonique. . . . .	833 à 1.000	

#### VALEUR ANTIGÈNE COMPARATIVE DES EXTRAITS ALCOOLIQUES DE BACILLES TUBERCULEUX ET DE MICROBES DIVERS.

Les antigènes extraits de différents microbes, suivant la technique précédemment indiquée, titrés en présence du même sérum antituberculeux ont fourni les résultats suivants :

		Valeur exprimée en unités d'alexine en présence de sérum de Vallée (dose : 0,5)	
Extraits alcooliques de bacilles humains et bovins.		833 à 1.000	unités.
—	— aviaires . . . . .	450	
—	— pisciaires . . . . .	400	
—	— paratuberc. (Korn). . . . .	375	
—	— paratuberculeux (Grassberger) . . . . .	333	
—	— diphtériques . . . . .	800 à 1.000	
—	— de cryptocoques . . . . .	50	
—	— de pneumocoques. . . . .	0	

Les bacilles tuberculeux aviaires et pisciaires et les bacilles paratuberculeux sont beaucoup moins riches en antigènes que les bacilles humains et bovins.

Les extraits de bacilles diphtériques fixent les anticorps tuberculeux comme les extraits de bacilles de Koch. L. Massol avait déjà fait une semblable constatation et montré que les bacilles diphtériques se comportent comme les bacilles tuberculeux dans la réaction de Bordet-Gengou. Cet expérimentateur attribuait ces résultats à des composants chimiques com-

muns aux deux microbes, et nous verrons, dans les chapitres suivants, que le pouvoir antigène des bacilles diphtériques, comme celui des bacilles tuberculeux, paraît être proportionnel à leur teneur en phosphatides.

Les extraits d'un champignon pathogène : le cryptocoque de la lymphangite épizootique, sont faiblement actifs.

Rogers a obtenu 23 p. 100 de réactions de déviation positives avec des sérums antituberculeux et des émulsions de produits lépreux, 37 p. 100 avec des émulsions de grassbacilles, 30 p. 100 avec le bacille du smegma, 24 p. 100 avec le staphylocoque et 8 p. 100 avec le *Bacillus coli*.

D'après Petroff, tous les bacilles acido-résistants donnent des extraits sodiques actifs dans la réaction de fixation des anticorps tuberculeux.

Les extraits de pneumocoques, qui d'ailleurs sont très pauvres en phosphatides, donnent des réactions de fixation constamment négatives, en présence de sérums antituberculeux.

Il résulte de ces expériences que les substances permettant d'obtenir une réaction de déviation positive, en présence des sérums antituberculeux, ne sont pas exclusivement contenues dans les bacilles de Koch. Toutefois, les différences observées sont nettement en faveur des bacilles humains et des bacilles bovins, ainsi que des bacilles diphtériques qui se comportent de façon à peu près identique, avec une légère supériorité pour les bacilles humains.

#### RELATIONS ENTRE LE POUVOIR ANTIGÈNE DES TUBERCULINES ET DES EXTRAITS ÉTHYLIQUES BACILLAIRES.

On sait, d'après plusieurs auteurs, que la tuberculine brute peut être employée comme antigène, mais que la tuberculine précipitée par l'alcool ne peut servir à cet usage (Calmette et Massol). Il était intéressant de rechercher si le liquide, séparé de son précipité, après traitement de la tuberculine brute par l'alcool absolu, conservait le pouvoir de fixer l'alexine en présence des sérums antituberculeux. Le résultat des essais effectués dans ce but fut complètement négatif. D'autre part l'activité des extraits alcooliques de bacilles privés de leur tuberculine n'est que faiblement diminuée, comparativement aux extraits

de bacilles totaux. L'épuisement des microbes à chaud, dans le bouillon glycérimé — en quoi consiste la préparation de la tuberculine — n'enlève donc pas leurs substances antigènes. Cependant, à la suite d'une macération prolongée, à 65°, des bacilles tuberculeux dans une solution concentrée (10 p. 100) de peptone de Witte riche en albumoses, ces mêmes substances se dissolvent. Le liquide, séparé par filtration de la masse bacillaire, acquiert ainsi un pouvoir fixateur spécifique comparable à celui des extraits les plus actifs. C'est l'antigène B<sup>2</sup> de Calmette et Massol.

L'antigène de Besredka, qui donne également d'excellents résultats dans la recherche des anticorps tuberculeux, est préparé au moyen de cultures de bacilles de Koch dans du bouillon de viande additionné de jaune et de blanc d'œuf. L'expérience nous a montré que sa seule partie active, dans la déviation du complément, était constituée par le liquide décanté après une centrifugation prolongée : une même quantité d'antigène total et d'antigène centrifugé, titrée au moyen du sérum de Vallée, fixe le même nombre de doses d'alexine. Le culot bacillaire, remis en émulsion dans une quantité d'eau physiologique égale à la quantité primitive, dévie très faiblement le complément (2 doses minima d'alexine, au lieu de 16 pour l'antigène total). L'antigène de Besredka ne doit donc ses propriétés ni aux microbes qu'il contient en suspension ni, d'après les observations faites au début de ce chapitre, à la tuberculine qu'il renferme. Il se comporte comme un extrait bacillaire.

Les extraits alcooliques de bacilles de Koch injectés aux animaux tuberculeux ne provoquent aucun trouble. Un cheval, réagissant fortement à la sous-cutituberculation, a supporté sans inconvénient 2 cent. cubes d'extrait méthylique, et l'injection intraveineuse de 20 cent. cubes d'extrait éthylique à une vache tuberculeuse n'a déterminé aucune hyperthermie.

#### SPÉCIFICITÉ DU POUVOIR ANTIGÈNE DES EXTRAITS ÉTHYLIQUES BACILLAIRES.

Les extraits éthyliques de bacilles tuberculeux ne dévient pas l'alexine en présence de sérums normaux (homme, cheval,



chien, bœuf), ni en présence de sérums provenant d'individus atteints de maladies autres que la tuberculose. Toutefois, les sérums très riches en anticorps syphilitiques peuvent donner une réaction positive avec l'antigène tuberculeux. Cet inconvénient paraît d'ailleurs commun à tous les extraits bacillaires, quel qu'en soit le mode de préparation.

Aucune déviation n'a été obtenue avec le sérum d'enfants atteints de diphtérie, ni avec les sérums d'animaux producteurs d'antitoxine diphtérique. Résultats également négatifs avec les sérums thérapeutiques suivants : antitétanique, antidysentérique, antiméningococcique, antistreptococcique, antipesteux, et antispirochétosique.

#### ESSAIS AVEC LE SÉRUM DES SUJETS SUSPECTS DE TUBERCULOSE OU CLINIQUEMENT TUBERCULEUX.

La recherche des anticorps dans le sérum des tuberculeux, au moyen de l'antigène éthylique, n'a pas donné de résultats aussi satisfaisants que les expériences faites avec le sérum des animaux préparés permettaient de l'espérer. Tantôt cet antigène se comporte comme l'antigène B<sup>a</sup> de Calmette et Massol ou l'antigène de Besredka, et dévie des quantités égales d'alexine en présence d'anticorps tuberculeux, tantôt, au contraire, il se montre complètement inactif, alors que les deux autres antigènes fixent, avec les mêmes sérums, des doses parfois élevées d'alexine.

Cette inégale activité de l'antigène éthylique restreignait considérablement son emploi. Nous avons alors essayé de le rendre plus sensible en augmentant sa concentration en corps bacillaires : 2 et 5 centigrammes de bacilles desséchés par centimètre cube d'alcool, au lieu de 1 centigramme. Mais il en résulte un accroissement du pouvoir anticomplémentaire tel que ces extraits deviennent pratiquement inutilisables.

La prolongation de la durée de la macération (douze jours au lieu de deux jours) à la température de l'étuve (37-38°) agit plus favorablement. L'antigène ainsi préparé est beaucoup plus actif, et son titre atteint 3.000 unités au lieu de 1.000. Néanmoins sa sensibilité n'est pas notablement augmentée.

Il convenait donc d'abandonner l'alcool éthylique dans la

préparation des extraits et de lui substituer un meilleur solvant des lipoides bacillaires, qui paraissent constituer, comme nous le montrerons dans les chapitres suivants, les véritables substances actives des antigènes tuberculeux.

### Extraits bacillaires à l'alcool méthylique.

Pétroff, qui a particulièrement étudié les extraits de bacilles de Koch, a préconisé l'antigène ainsi préparé : 250 milligrammes de bacilles tuberculeux secs et pulvérisés sont traités par 50 cent. cubes d'alcool méthylique pendant cinq à dix jours à 38°, puis la macération est conservée à la température du laboratoire, à l'abri de la lumière. Après plusieurs semaines, le liquide surnageant est décanté et réparti en ampoules scellées ou en flacons bien bouchés, à cause du pouvoir absorbant de l'alcool méthylique vis-à-vis de l'eau. Au moment de l'emploi l'extrait est dilué dans l'eau physiologique.

Cet antigène, largement utilisé dans l'armée américaine, aurait, d'après Pétroff, l'inconvénient de donner des réactions de fixation positive dans les cas de tuberculose éteinte ou occulte.

Nous avons essayé de remédier à cette défectuosité en appliquant aux extraits méthyliques bacillaires la technique employée pour la préparation des extraits éthyliques :

Des bacilles humains et bovins, provenant de cultures sur bouillon glyciné, âgées de 6 semaines, sont stérilisés par un chauffage de trente minutes à 120°, filtrés sur papier et mélangés à parties égales. Les corps bacillaires sont ensuite lavés sur le filtre à l'eau distillée, puis desséchés à l'étuve ou dans la cloche à vide. Les microbes secs sont traités par de l'acétone pendant vingt-quatre heures (1 cent. cube d'acétone par centigramme de bacilles), desséchés de nouveau, et finalement mis à macérer dans l'alcool méthylique à 99° (1) (1 cent. cube d'alcool par centigramme de bacilles). On laisse en contact pendant dix à douze jours à 37-38°, en agitant fréquemment. Le liquide, séparé par filtration du dépôt microbien, constitue l'antigène tuberculeux que nous employons à la dose de un vingtième de centimètre cube, soit 1 cent. cube de la dilution

(1) Il est indispensable d'employer de l'alcool méthylique à 99°; l'action dissolvante des alcools à titre plus faible étant presque nulle.

au vingtième dans l'eau physiologique. Le pouvoir empêchant de cette dilution est nul en présence de la dose minima active d'alexine.

Les extraits méthyliques, conservés suivant les indications de Pétroff, fournissent à froid un précipité assez abondant qui se dépose sous la forme de petites masses blanches. Ce précipité se redissout entièrement lorsque le liquide est porté à 45-50°.

Au moment de l'emploi l'antigène, rendu limpide par un séjour de quelques minutes à l'étuve, ou au bain-marie à 50°, est additionné d'abord goutte à goutte, puis plus rapidement, d'eau physiologique dans les proportions indiquées. L'émulsion ainsi obtenue a le même aspect et la même homogénéité qu'une émulsion aqueuse de lécithine au 1/10.000 environ. Pour éviter les échecs, il est indispensable de se conformer à cette technique.

#### TITRAGE DE L'ANTIGÈNE MÉTHYLIQUE.

Ce titrage a été effectué au moyen d'un sérum antituberculeux de cheval, d'après les méthodes de Calmette et Massol précédemment exposées :

1° En faisant décroître les quantités d'antigène en présence d'une dose fixe de sérum antituberculeux et d'alexine. Le rapport  $\frac{N}{V}$  ainsi déterminé indique une valeur de 3.000 unités, à la fois pour l'antigène méthylique et l'antigène éthylique préparé dans les mêmes conditions.

2° En faisant croître les quantités d'alexine en présence de doses fixes de sérum de Vallée et d'antigène. Le rapport  $\frac{N}{V} = 60$  pour l'antigène méthylique, et 30 seulement pour l'antigène éthylique. Le pouvoir fixateur de l'extrait méthylique est donc double du pouvoir fixateur de l'extrait éthylique. Comparés, à ce même point de vue, les extraits méthyliques et l'antigène de Besredka se comportent de façon identique.

#### DOSAGE DES PHOSPHATIDES DES EXTRAITS ÉTHYLIQUE ET MÉTHYLIQUE BACILLAIRES PAR LA MÉTHODE DE RÉACTIVATION DU VENIN DE COBRA.

Il était intéressant de rechercher si l'alcool méthylique, solvant des lécithines, lorsqu'il est complètement déshydraté,



entraîne avec lui les substances du même groupe que contiennent les bacilles de Koch, et dans quelle mesure l'activité antigène est fonction de leur teneur en phosphatides.

Nous avons appliqué, à cet effet, la méthode de réactivation du venin de cobra de Calmette et Massol qui — l'action des acides gras ne pouvant être retenue dans les conditions de l'expérience — permet d'effectuer un dosage précis de ces substances, par comparaison avec une solution titrée de lécithine. La technique suivie est indiquée par le tableau ci-après :

Solution de venin au 1/500	Globules de cheval au 1/20	Extrait éthylique de bacilles tuberculeux au 1/10		Lécithine au 1/10.000	
			Résultats		Résultats
1 c. c.	1 c. c.	0,1	0	0,02	0
		0,2	0	0,05	H
		0,3	H	0,1	H
		0,4	H	0,2	»
		0,5	H	0,3	»
		0,6	H	0,4	»
		0,7	H	0,5	»
		0,8	H	0,6	»
		0,9	H	0,7	»
		1	H	0,8	»
				0,9	»

Le volume du liquide est complété, avec de l'eau physiologique, à 3 cent. cubes dans tous les tubes, puis les mélanges sont portés à l'étuve à 37°, et on lit les résultats au bout d'une demi-heure.

Le précédent titrage montre que 1 cent. cube de l'extrait éthylique bacillaire correspond, dans la réactivation du venin de cobra, à 0 gr. 00002 de lécithine (lécithine pure de l'œuf).

L'extrait méthylique des mêmes bacilles est 5 fois plus riche en phosphatides : 1 cent. cube équivaut à 0 gr. 0001 de lécithine.

Les extraits éthyliques de bacilles diphtériques, qui fournissent une réaction de fixation positive avec les sérums antituberculeux, ont la même teneur en phosphatides que les extraits méthyliques de bacilles de Koch. Ceux des bacilles paratuberculeux en renferment un peu moins, et les microbes, comme le pneumococque, qui sont inactifs en présence de sérums antituberculeux, ne donnent aucune hémolyse avec le venin de cobra.

Il semble donc que les phosphatides, dissous dans les extraits bacillaires, jouent, comme le pensait K. Meyer, un rôle fondamental dans la réaction de déviation du complément. Cependant, les solutions d'ovoléithine n'ont aucun pouvoir antigène, et l'addition de cette substance aux extraits alcooliques de bacilles tuberculeux n'augmente pas leur activité.

#### ACTIVITÉ ET SENSIBILITÉ COMPARÉE DES DIVERS ANTIGÈNES.

Un bon antigène doit déceler la totalité des anticorps contenus dans un sérum, et donner une réaction positive pour la plus faible trace de la sensibilisatrice correspondante. Sa valeur et celle des anticorps se mesure au nombre de doses d'alexine fixées rapporté à l'unité de volume. Les résultats du titrage comparatif des différents antigènes sont indiqués dans les tableaux suivants :

A. Titrage des anticorps contenus dans 0 c. c. 5 d'un échantillon de sérum de Vallée, en présence d'un excès d'antigène tuberculeux.

B. Titrage comparé des anticorps contenus dans 0 c. c. 3 de sérums de tuberculeux ou suspects.

	Nombre de doses minima d'alexine fixée	Quantité d'antigène
		c. c.
Extrait éthylique direct . . . . .	8	0,1
Emulsion de bacilles biliés (1 mmg par c. c.) .	36	1
Extrait peptoné aqueux . . . . .	40	0,1
— éthylique après traitement acétonique.	40	0,1
— méthylique . . . . .	60	0,1
Antigène de Besredka . . . . .	60	0,3

N° des sérums	Nombre de doses minima d'alexine fixées avec	
	Extrait méthylique	Antigène de Besredka
1	0	0
2	0	0
3	0	0
4	4	4
5	0	0
6	5	5
7	5	5
8	0	0
9	5	5
10	5	4

APPLICATION DE L'EXTRAIT MÉTHYLIQUE A LA RECHERCHE DES ANTICORPS  
DANS LE SÉRUM DES TUBERCULEUX.

La recherche des anticorps dans le sérum des malades a été effectuée d'après la technique suivante :

A 0 c. c. 3, par tube, de sérum on ajoute 0 c. c. 5 d'antigène au dixième et des doses d'alexine au quinzième croissant de 0,1 à 0,5 ; puis on complète à 2 c. c. 5 avec de l'eau physiologique. Après une heure de contact à 37°, on ajoute le système hémolytique (20 doses de sensibilisatrice antimouton et 1 goutte de globules de mouton). Contact à 37° pendant trois quarts d'heure, puis lecture des résultats.

L'alexine est, au préalable, titrée. Trois tubes témoins additionnés de doses croissantes d'alexine sont nécessaires pour le titrage du pouvoir anticomplémentaire du sérum et de l'antigène seuls.

Sur 90 sérums humains provenant d'individus suspects de tuberculose, 41 ont fourni une réaction positive, soit 45 p. 100. La proportion des résultats positifs, à des taux d'alexine variant de 2 à 5 doses minima, s'est élevée, pour les tuberculeux en évolution, à 95 p. 100 (57 sur 60 examinés).

### Conclusions.

Les antigènes, obtenus en faisant agir successivement l'acétone et l'alcool méthylique à 99° sur les bacilles tuberculeux, se sont montrés rigoureusement spécifiques. Exceptionnellement ils dévient l'alexine avec certains sérums de syphilitiques. Il est possible que, dans ces cas, la sensibilisatrice décelée soit non d'origine syphilitique, mais d'origine tuberculeuse.

Leur sensibilité est très grande ; comme l'antigène peptoné de Calmette et Massol et comme l'antigène à l'œuf de Besredka, ils fournissent une réaction positive avec le sérum des tuberculeux, même en présence de très faibles quantités d'anticorps. Ils offrent l'avantage d'une préparation facile et d'une conservation indéfinie, à la condition d'être tenus à l'abri de l'humidité, de l'air et de la lumière.

L'inaltérabilité des extraits méthyliques bacillaires et la



fixité de leur composition permettront d'étudier, chez les malades, dans des conditions expérimentales toujours identiques, l'évolution des anticorps, d'en effectuer le titrage avec précision, et de déterminer l'importance de leurs variations dans le pronostic de la tuberculose.

(Laboratoire du professeur Calmette, à l'Institut Pasteur.)

### BIBLIOGRAPHIE

H. AGULHON et A. FROUIN, Etudes sur les matières grasses du bacille tuberculeux. *Bull. Soc. chimie biol.*, novembre, décembre 1919, **1**, n° 4.

BESREDKA. Ces *Annales*, 1914, p. 428, novembre 1913.

A. BOQUET et L. NÈGRE, Valeur antigène des extraits alcooliques de bacilles tuberculeux et des émulsions de bacilles tuberculeux biliés. Section d'études scientifiques de l'œuvre de la tuberculose, séance du 12 juin 1920, in *Revue de la tuberculose*, 1920, **1**, n° 4.

— Mode de préparation et pouvoir antigène des extraits alcooliques de bacilles tuberculeux. *C. R. Soc. de Biol.*, séance du 19 juin 1920, **83**, p. 922.

BORDET et RULENS, L'antigène syphilitique de l'Institut Pasteur de Bruxelles. *C. R. Soc. de Biol.*, **82**, p. 880.

A. CALMETTE, L'infection bacillaire et la tuberculose chez l'homme et chez les animaux. Masson et C<sup>ie</sup>, éditeurs, Paris, 1920.

A. CALMETTE et L. MASSOL, Les anticorps tuberculeux et leur rôle dans la défense de l'organisme contre l'infection tuberculeuse. *Bull. de l'Institut Pasteur*, 1916, p. 33, 65, 97.

A. CALMETTE, MASSOL et BRETON. *C. R. Acad. des Sciences*, 30 mars 1908.

A. GORIS, Composition chimique du bacille tuberculeux. Ces *Annales*, août 1920, **34**, p. 497.

KURT MEYER, Sur les composantes fixatrices du complément chez le bacille tuberculeux, *Zeitsch. für Immunitätsforschung*, 1912, **14**, f. 3.

MASSOL et GRYZEZ. *C. R. Soc. de Biol.*, 1914, **77**, p. 428.

L. NÈGRE et A. BOQUET, Valeur antigène comparative des extraits alcooliques de bacilles tuberculeux et de microbes divers. *C. R. Soc. de Biol.*, séance du 26 juin 1920, **83**, p. 960.

— Sur le pouvoir antigène des extraits méthyliques de bacilles tuberculeux. *C. R. Soc. de Biol.*, séance du 15 janvier 1921, **84**.

NOGUCHI. *Journ. of exper. med.*, 1909, **11**.

S. A. PETROFF, Serological studies in tuberculosis. *Amer. review of tuberculosis*, mars 1917, **1**, n° 1.

— Serological studies on tuberculosis. Second contribution, further observations on complement fixation. *Amer. review of tuberculosis*, janvier 1920, **3**, n° 11.

J.-B. ROGERS, Fixation du complément dans la tuberculose et comparaison des méthodes de Wassermann et de Hecht-Weinberg-Gradwohl. *Journ. of infectious diseases*, août 1920, **27**, n° 2, p. 101.

# RECHERCHES SUR LA THÉORIE DE L'ANAPHYLAXIE

par le Professeur ERNEST PESCI,  
docente nella R. Università di Torino,  
vice primario dell'ospedale Maggiore di San Giovanni.

Ce travail a été le sujet d'une communication  
au Congrès international de Physiologie, Paris 16-20 juillet 1920.

(Travail de l'Institut d'Hygiène de l'Université de Turin.)

## Rapports entre la protéolyse et l'anaphylaxie.

Mes nombreuses expériences peuvent être divisées en quatre groupes :

a) Les cobayes mis à un régime monophagique de lait ou d'œufs présentent une réaction prononcée à la ninhydrine, mais jamais des réactions d'anaphylaxie.

b) Les cobayes préparés par des injections de la paroi interne de kysles hydatiques présentent constamment la réaction d'anaphylaxie et presque jamais la réaction d'Abderhalden.

c) Les cobayes préparés par des injections de blanc d'œuf présentent la réaction d'Abderhalden et celle d'anaphylaxie avec persistance de la dernière, alors que la première disparaît.

d) Les cobayes traités par le blanc d'œuf comme les précédents présentent, pendant une première période, la réaction d'Abderhalden, mais non celle de l'anaphylaxie passive, tandis que plus tard les deux réactions donnent des résultats inverses.

Notons de suite que chez cinq cobayes, qui présentaient la protéolyse et l'anaphylaxie active très prononcée, la réaction protéolytique, contrôlée une demi-heure après le choc, n'était pas modifiée.

Les ferments protéolytiques et les antialbumines anaphylactiques représentent deux manières diverses de réaction contre l'antigène. Les deux réactions se développent indépendamment l'une de l'autre : elles peuvent coexister pendant la première période ; une des réactions peut être présente et l'autre peut

faire défaut. Dans la période finale, l'anaphylaxie persiste tandis que la protéolyse est déjà éteinte.

Donc, si le même sérum provenant de la même saignée du même animal ne présente pas la réaction à la ninhydrine, tout en transmettant l'anaphylaxie passive, il s'ensuit que les ferments protéolytiques représentent une fonction différente de celle des antialbumines anaphylactiques : on peut donc affirmer que la crise anaphylactique n'est pas en rapport avec la digestion parentérale de l'antigène.

### Rapports entre l'anaphylaxie et les plaquettes.

Des numérations des plaquettes chez quatre cobayes normaux ont donné des chiffres variant entre 400.000 et 500.000 par millimètre cube. Les hématies sont de 5 millions à 5 millions et demi par millimètre cube. Le rapport normal entre plaquettes et hématies oscille entre 1:10 à 1:14. Le jeûne n'exerce aucune influence sur le nombre des plaquettes ni des hématies.

La chute du nombre des plaquettes est énorme immédiatement après le choc anaphylactique ; ce nombre tombe à 28.000, ce qui donne le rapport de  $P/H = 1:163$ . Les contours et le diamètre des plaquettes après le choc paraissent plus irréguliers.

J'ai constaté les mêmes résultats après le choc anaphylactoïde produit par la peptone Witte. La diminution du nombre des plaquettes est proportionnelle à la gravité du choc ; le nombre redevient normal 36-48 heures après l'injection déchainante.

### Rapport entre le choc anaphylactique et les caractères physiques des sérums.

Plusieurs substances ont été employées pour supprimer le choc. Parmi ces dernières il y en a qui abaissent la tension superficielle, et d'autres qui l'augmentent. J'ai constaté une forte augmentation de la tension superficielle chez le lapin et le cobaye à la suite de l'injection de  $\text{CaCl}_2$  à 1 p. 100.

Je me suis demandé quel est le mécanisme de l'action anti-anaphylactique de l'oléate de soude et des sels biliaires, lesquels abaissent la tension superficielle, et d'autre part, celui de



$\text{CaCl}_2$  qui agit de même, tout en augmentant la tension. Je suppose que l'acidité ou l'alcalinité du plasma, c'est-à-dire la concentration des ions hydrogène et par conséquent la modification de la charge électrique de contact jouent un rôle important. L'oléate de soude est un savon qui agit en vertu de son action hydrolytique.

On sait que l'oléate de soude et les sels biliaires sont des savons d'acides faibles, qui, dissous dans l'eau, abaissent la tension superficielle, et se dissocient par hydrolyse en  $\text{Na}^+$  et un radical acide ( $\text{R}^-$ ). On sait que ce radical se combine avec l'H pour former un acide non dissociable. Je suppose qu'il y a une soustraction d' $\text{H}^+$  ions, ce qui a pour effet, pendant quelque temps, un excès dans le sang circulant de  $\text{OH}^-$  ions; l'alcalinité du plasma augmente, ce qui entraîne le ralentissement de la réaction anaphylactique suivante.

Dans la supposition que c'est la plus grande alcalinité qui soit la cause de la suppression du choc, j'ai injecté 8 cent. cubes de solution N/100 de NaOH dans le liquide de Ringer privé du  $\text{CaCl}_2$  à des cobayes dix minutes avant l'injection déchaînante; j'ai réussi à supprimer ainsi le choc anaphylactoïde et anaphylactique. J'ai répété les mêmes expériences avec la solution N/100 de HCl dans le liquide de Ringer privé du  $\text{CaCl}_2$ ; le syndrome anaphylactique et anaphylactoïde se déroulèrent avec les phénomènes bien connus. Donc un excès d'acide, s'il n'est pas favorable, n'empêche pas en tout cas le choc anaphylactique.

Il reste encore à savoir si les substances antianaphylactiques modifient momentanément les conditions de réaction ou si elles transforment profondément les colloïdes participant à la réaction? L'hypothèse, qui me paraît la plus logique, est qu'il se produit un changement de la charge électrique sans modification des affinités chimiques. L'action antianaphylactique de l'oléate de soude, sur lequel j'ai expérimenté, est d'une plus courte durée que celle de l'injection déchaînante.

### Caractères de l'anaphylaxie en comparaison avec ceux des phénomènes anaphylactoïdes.

Les tableaux du choc anaphylactique et anaphylactoïde sont identiques, mais l'origine des phénomènes est essentiellement

différente. L'antigène anaphylactique peut être introduit à la dose d'un centigramme et pendant un certain laps de temps il provoque des intermédiaires dans l'organisme, jusqu'à ce que l'injection déchaînante puisse déterminer le choc. Dans le choc anaphylactoïde, l'incubation n'est pas nécessaire, et il faut par contre employer des doses élevées. Il est donc manifeste que dans la pathogénie de l'anaphylaxie il existe une première période d'élaboration pendant laquelle une modification spéciale des colloïdes introduits a lieu silencieusement. Ces colloïdes conservent leur stabilité dans le complexe normal du plasma, jusqu'à ce que, sous l'influence de l'injection déchaînante, la labilité caractéristique du système se révèle.

La première dose d'antigène reste quelque temps dans l'organisme avant d'être désintégrée complètement. Dans une première phase, l'antigène doit passer par des transformations progressives, jusqu'à ce qu'il soit par certains caractères rapproché de la structure des colloïdes normaux et graduellement assimilé. L'antigène subit une métatipie, mais tout en conservant quelques-uns de ses caractères primitifs.

Dans la deuxième phase, l'antigène métamorphosé va remplacer un groupement colloïdal normal dans l'intérieur de la cellule. Par conséquent, la cellule finit par imprimer un nouveau caractère à ses colloïdes vivants. Mais ce qui importe, c'est que, stimulée par le nouveau produit dérivé de l'antigène, la cellule continue à fabriquer, par synthèse, des groupements colloïdaux identiques; cette production autochtone dure pendant toute la période anaphylactique.

On comprend que des injections préparantes plus fortes ou des injections répétées produisent un grand nombre de colloïdes de réaction et par conséquent une sensibilité anaphylactique plus exquise. Après un certain laps de temps, les cellules, et en conséquence le plasma, contiennent des colloïdes sessiles et des colloïdes transmissibles passivement. Ces colloïdes conservent une telle affinité pour l'antigène primitif que, lors de l'injection déchaînante, il se produit des phénomènes d'attraction et de floculation, qui représentent le *primum movens* de la réaction anaphylactique.

La première attraction serait due à l'affinité physico-chimique. Les altérations qui suivent immédiatement représentent seule-

ment des changements d'état physique, elles appartiennent aux deux réactions anaphylactique et anaphylactoïde. On sait que les phénomènes chimiques entre les colloïdes sont très lents : les modifications exercées par l'antigène sur les colloïdes de réaction sont instantanées ; elles doivent donc être de nature physique.

### Mécanisme du choc anaphylactique.

Les phénomènes de floculation anaphylactique représentent une réaction qui s'accomplit dans les humeurs et au sein des cellules. La floculation dans les humeurs donne lieu au choc. On sait pourtant que les organes, qui sont les plus touchés au cours de la crise anaphylactique, sont les poumons chez le cobaye, la peau chez l'homme, l'intestin et les reins chez le chien. Le cerveau n'est presque pas atteint. Les tissus qui sont les plus atteints par les produits de réaction favorisent *in situ* l'obstruction des capillaires par des thrombus. C'est là qu'il faut chercher l'explication du phénomène d'Arthus et la raison pour laquelle une injection d'extrait de pollens détermine un asthme de foin.

On comprend que l'on ait trouvé dans le sérum un accroissement remarquable de l'azote aminé pendant le choc et que dans la période suivante on trouve une formidable élimination d'azote urinaire : les albumines floculées subissent en grande partie une combustion rapide.

Si je dois résumer les diverses phases de la réaction anaphylactique, je résumerai ma théorie par le schéma suivant :

**1<sup>re</sup> PHASE.** — L'antigène, après la première introduction dans le sang, est modifié graduellement, jusqu'à ce qu'il devienne partie intégrante des colloïdes vivants et leur imprime un caractère nouveau, notamment une affinité particulière pour l'antigène primitif.

**2<sup>e</sup> PHASE.** — Les cellules, stimulées par le nouveau produit dérivé de l'antigène, fabriquent par synthèse des albumines identiques au nouveau produit avec la même affinité physico-chimique pour l'antigène primitif. Ces nouveaux produits sont abondants dans le plasma et dans certains tissus.



3<sup>e</sup> PHASE. — L'antigène introduit lors de l'injection déchaînant réagit avec les colloïdes modifiés, il les floccule, d'où la crise anaphylactique. La flocculation intravasculaire donne lieu à des conglomerats de plaquettes et à des embolies capillaires, d'où le choc foudroyant. La flocculation intracellulaire donne lieu à une commotion cellulaire, aggrave le choc et favorise *in situ* des obstructions capillaires, suivies des réactions générales et locales.

Les syndromes du choc anaphylactique et anaphylactoïde sont identiques, mais ils ont une pathogénie différente. Dans les réactions anaphylactoïdes nous n'avons pas besoin d'une période d'incubation pour la formation des intermédiaires, les phénomènes se développent de la même façon par flocculation. Il y a une différence de degré : la réaction d'anaphylaxie est beaucoup plus sensible.

Turin, 14 octobre 1920.

**SUR LE MÉCANISME**  
**DE L'ACTION DES RAYONS ULTRA-VIOLETS**  
**SUR LA CELLULE**

par le D<sup>r</sup> SERGE TCHAHOTINE.

On sait que l'application de l'énergie rayonnante dans les recherches de biologie expérimentale a acquis aujourd'hui une grande importance : on connaît les phénomènes vitaux, dus à l'action photochimique de la lumière, comme l'assimilation de  $\text{CO}_2$  par les plantes, les réactions rétinienne dans la vision, on a établi que les divers rayonnements ultra-violet, de Röntgen, du radium, et même des rayons visibles en milieu sensibilisé par certaines substances dites photodynamiques ont un pouvoir fortement irritant, même mortifiant : on connaît l'action purificatrice des lampes à mercure sur l'eau potable, et qui est appliqué maintenant en grande échelle par les municipalités, on connaît enfin l'application des rayons du radium et de Röntgen dans la thérapeutique du cancer, des rayons ultra-violet dans diverses maladies de la peau et les ulcères (méthode de Finsen), etc. D'autre part, dans le domaine des sciences physiques et chimiques, l'étude des radiations, au point de vue photochimique, a pris aussi, pendant les dernières années, une large extension. C'est pourquoi le problème du mécanisme ou chimisme intime de l'action des rayonnements présente un haut degré d'importance en même temps théorique et pratique.

En 1912, au cours de mes recherches sur la cytologie expérimentale, je suis parvenu à élaborer une nouvelle méthode de micro-vivisection, que j'ai appelée la méthode de radio-piqûre microscopique (1). Elle consiste en ce que sur un point voulu d'une seule cellule isolée — à sa périphérie ou à l'intérieur, par

(1) TSCHACHOTIN, Die mikrokopische Strahlstichmedode, *Biol. Centralbl.*, 1912, 33, p. 623. — TCHAHOTINE, La radiopuncture microscopique. *C. R. Acad. des Sciences*, 1920, séance du 13 décembre 1920.

exemple sur le noyau seul (1) — j'applique un faisceau extrêmement fin de rayons ultra-violets, un dard microscopique rayonnant, qui me permet de localiser expérimentalement la mortification ou l'irritation d'un élément quelconque constitutif de la cellule.

Dès le début de mes recherches, je me suis heurté à certaines difficultés, qui m'ont contraint d'aborder la question du mécanisme de l'action des rayonnements sur la matière vivante. Mes premières recherches (2) sur cette question en 1912-14, malheureusement interrompues par la guerre, m'ont amené à croire, au début, que nous nous trouvions en présence, surtout en premier lieu, d'une action des rayons sur le cytoplasme de la cellule. On connaît les recherches de V. Henri (3) et de ses collaborateurs sur le pouvoir abiotique de ces rayons, qui ont montré d'une part un haut pouvoir absorbant du cytoplasme et des matières protéiques pour ces rayons, d'autre part leur grande toxicité pour les organismes unicellulaires et les cellules isolées des Métazoaires, ainsi que leur pouvoir coagulant sur les colloïdes. Une hypothèse considère l'action des rayonnements comme due à la destruction dans la cellule de certains enzymes, une autre envisage leur action réductrice, une troisième encore croit que ce sont spécialement les composés lécithiques, qui sont désagrégés avant tout par ces rayons. Cette dernière hypothèse, émise par Schwarz et soutenue par Werner, est intéressante, parce qu'elle se base sur le fait que ce sont surtout les cellules riches en lécithides, comme par exemple les œufs, les cellules cancéreuses, qui sont plus sensibles. En poursuivant cet ordre d'idées, on s'est demandé ce qui résulterait de la désagrégation photochimique de la lécithine, et on vit facilement apparaître, comme un des produits de cette démolition, la choline. Le fait intéressant est, que Werner (4) a réussi à

(1) TCHACHOTINE, Action localisée des rayons ultra-violets sur le noyau de la cellule par moyen de la radio-piqûre microscopique, 1920. *C. R. Soc. Biol.*, 83, p. 1593.

(2) TSCHACHOTIN, Ueber Strahlenwirkung auf Zellen und die Frage der chemischen Imitation derselben. *Munch. med. Woch.*, 1912, 44.

(3) V. HENRI. *C. R. Soc. Biol.*, 72-73, 1912.

(4) WERNER, Experim. Untersuch. über die Wirkung von Radiumstrahlen und d. Rolle des Lecithins bei derselben. *Zentral. f. Chir.*, 1907, 73. — Ueber die chem. Imitation der Strahlenwirkung und Chemotherapie des Krebses. *Medizin. Klinik*, 1912 28.



imiter, comme il dit, chimiquement l'action des rayonnements, en injectant à des animaux, ayant des tumeurs malignes, des préparations de la choline et en observant un ramollissement et une destruction de ces tumeurs : c'étaient précisément les cellules cancéreuses qui se cytolysaient électivement.

Mes recherches faites dans cet ordre d'idées, surtout sur d'autres cellules, riches en lécithine, et notamment les œufs d'oursins (1), me permirent tout d'abord d'admettre cette hypothèse; je me servais dans ce but d'un moyen microchimique : la coloration vitale des œufs par le rouge neutre. On sait qu'en présence des ions OH, c'est-à-dire dans un milieu alcalin, cette substance vire au jaune orange. Or les œufs d'oursins, colorés en rouge vif, après être irradiés, accusaient, au bout d'un certain temps, ce virage; on observait le même virage en les traitant, sans irradiation, par une solution de choline. Cette solution, on le sait, est une base assez forte et se dissocie facilement, en mettant les ions OH en liberté.

Les recherches ultérieures me démontrèrent que, dans le bref espace de temps qui est suffisant pour la cytolysé des œufs par les rayons ultra-violets, la formation de la choline par désagrégation photochimique des lécithides ne pouvait pas avoir lieu, mais qu'il s'agissait surtout de l'action des rayons ultra-violets sur la couche superficielle du cytoplasme, dite aussi membrane plasmique, laquelle, sous l'action de ces rayons, devenait plus perméable aux ions alcalins du milieu, qui, en pénétrant, y provoquaient le virage du rouge neutre. L'expérience, faite dans ce but et qui consistait à placer les œufs dans une solution en l'absence des ions OH, c'est-à-dire dans un mélange de  $100 \text{ c. c. } \frac{5m}{8} \text{ NaCl} + 2 \text{ c. c. } \frac{5m}{8} \text{ KCl} + 2 \text{ c. c. } \frac{5m}{8} \text{ CaCl}_2$ , a montré qu'en irradiant les cellules, colorées en rouge par le rouge neutre, on n'obtenait au début aucun virage. Mais dans un délai de dix à douze heures les cellules étaient devenues jaunes. La décoloration n'était guère due à une diffusion du colorant en dehors par la membrane, devenue perméable à cause de l'irradiation, puisque, en ajoutant quelques gouttes d'acide butyrique  $\frac{m}{10}$ , on observait le retour immédiat du rouge dans la cel-

(1) *Strongylocentrotus lividus*.

lule. Ainsi il était prouvé que les ions OH pouvaient provenir des substances à l'intérieur de la cellule.

En me basant sur ces faits, je me suis posé la question de savoir, si dans la cytolyse en général, provoquée par divers agents, on avait également la libération à l'intérieur de la cellule des ions OH. Dans ce but, je fis cytolyser des œufs colorés au rouge neutre dans un milieu sans ions OH et dans un autre, les contenant, en les traitant une fois par une solution fortement hypertonique, et une autre fois par une solution hypotonique, ajoutant en ce dernier cas simplement une grande quantité d'eau distillée. Les expériences montrèrent que, dans le premier cas, se produisait dans la cellule une réaction alcaline, c'est-à-dire qu'il y avait bien la formation d'une base; dans le deuxième cas, il n'y en avait point.

Tous ces faits me conduisent à admettre l'hypothèse suivante de l'action des rayons ultra-violets sur l'œuf : les rayons agissent en premier lieu sur la couche superficielle, coagulant ses colloïdes et en tout cas en la rendant plus perméable; mes expériences récentes sur l'augmentation de la perméabilité de l'œuf, sous l'action des rayons ultra-violets (1), le prouvent suffisamment; comme résultat de la perméabilité accrue et de la pénétration de certains ions du milieu, il s'ensuivrait une décomposition partielle des lécithides et la formation, à l'intérieur de la cellule, de choline ou d'une autre base analogue; la choline décomposerait ensuite les particules des lécithides adjacentes, ce qui augmenterait encore la quantité de choline et ainsi de suite, jusqu'à la complète cytolyse de l'œuf : on aurait dans ce cas une sorte d'autolyse. Le virage du rouge neutre au jaune, à l'intérieur de la cellule irradiée, serait ainsi dû à cette choline, dérivant de l'autolyse des composés lécithiques de l'œuf.

La cytolyse par les rayons ultra-violets se manifeste assez vite par la séparation du corps de la cellule d'une masse hyaline homogène très réfringente. Or, le cytoplasme de l'œuf d'oursin étant constitué par une émulsion des colloïdes protéiques et lipoïdes, vraisemblablement en grande partie lécithiques, on pourrait penser que les premiers forment une couche très mince, enveloppant les particules des seconds, et les stabili-

(1) TCHAHOTINE, Les changements de la perméabilité de l'œuf d'oursin localisés expérimentalement. *C. R. Soc. Biol.*, 1921, 84, p. 764.

sant. Dans ce cas, il est probable que l'action des ions qui pénètrent dans la cellule, et y produisent la décomposition des lécithides, se manifeste surtout par la coagulation ou la précipitation de cette phase protéique du cytoplasme; les gouttelettes de la phase lécithique, devenant alors libres, se confondent et se fusionnent en formant la masse hyaline. Pendant l'action des rayons ultra-violets, on observe un gonflement de la cellule, qui précède et accompagne la cytolyse et qui devrait être dû à l'imbibition des colloïdes à l'intérieur de la cellule sous l'influence des ions OH, formés par la décomposition des lécithides : on sait que ces ions font gonfler les colloïdes.

### CONCLUSIONS

L'action des rayons ultra-violets sur l'œuf d'oursin serait la suivante :

1° Les rayons affectent, en premier lieu, la couche plasmatiche, en coagulant ses colloïdes et en augmentant ainsi sa perméabilité;

2° Les ions du milieu ambiant, en pénétrant, grâce à cet accroissement de la perméabilité, précipitent les colloïdes protéiques du cytoplasme, qui entourent les gouttes colloïdales lécithiques;

3° Celles-ci, devenant libres, se confondent, en formant la masse hyaline;

4° Cette masse hyaline est décomposée et donne origine à une base (choline?);

5° Laquelle augmente cette décomposition et dont les ions OH provoquent un gonflement par imbibition des colloïdes protéiques du cytoplasme, jusqu'à la complète désagrégation de la cellule.

(Travail fait au Musée océanographique de Monaco  
et au Laboratoire russe de zoologie à Villefranche-sur-Mer.)

**RECHERCHES EXPÉRIMENTALES**  
**AVEC UN SPIROCHÈTE,**  
**SE TROUVANT SPONTANÉMENT CHEZ LE LAPIN**  
**ET RESSEMBLANT AU *TREPONEMA PALLIDUM***

(COMMUNICATION PRÉLIMINAIRE)

par le Dr A. KLARENBECK.

Cinq lapins hollandais adultes (dont un bouquin) apparemment en bonne santé, appartenant tous au même propriétaire, furent achetés en octobre 1920, parce qu'ils étaient porteurs de lésions de la région périnéale (fig. 2). La région de l'anus et de la vulve, de l'anus et du prépuce était fort enflammée. Le tout proéminait plus ou moins sur les tissus environnants, de sorte que les ouvertures naturelles étaient à peine visibles à cause de l'enflure. Les croûtes sèches, qui couvraient le centre de l'endroit enflammé, tenaient en général ferme à la peau, elles étaient d'une nuance rouge-brun foncé; celles qui se trouvaient à la périphérie avaient un aspect écaillieux, elles étaient très petites et peu adhérentes. Les poils étaient tombés à l'endroit de la lésion, à la périphérie ils tenaient encore en partie. La peau d'alentour, non recouverte de petites écailles blanches, était rouge et enflée, œdémateuse. Sous les croûtes adhérentes enlevées existait une surface rouge, légèrement saignante. En saisissant les tissus entre le pouce et l'index, de sorte qu'on pressait sur toute la région périnéale saillante, les croûtes quelquefois se détachaient soudainement en partie et parfois le tissu lui-même se déchirait et laissait une surface couverte de fentes.

En raclant la surface et en éloignant les croûtes on obtenait un liquide qui contenait dans tous les cas de nombreux spirochètes dont le mouvement pouvait être constaté dans le champ obscur à la température de la chambre. Les spirochètes avaient



un mouvement vif comme celui d'une anguille et étaient faiblement réfringents. Ils étaient aussi animés de mouvements tournants comme celui d'une corde balancée dans le jeu d'enfants appelé « saut à la corde ». Quand le parasite se heurtait contre un objet quelconque, le mouvement devenait

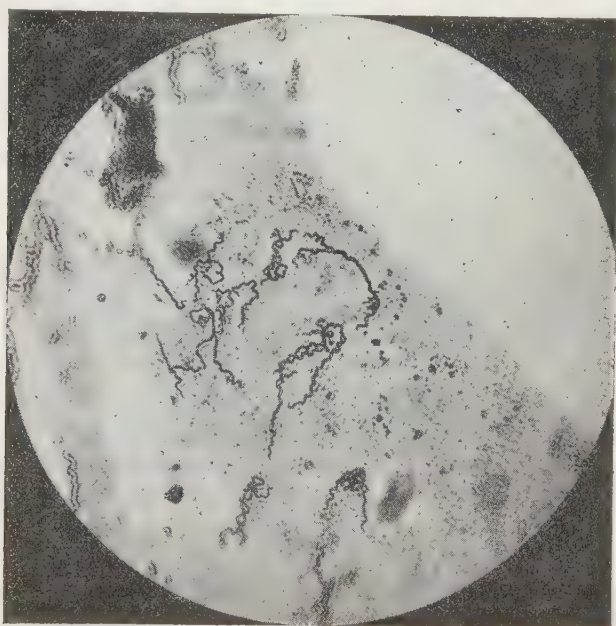


FIG. 1. — Coloration de l'argent de Fontana (1.050). Raclage superficiel de la cornée. Six semaine après l'inoculation intra-oculaire.

très vif et ressemblait beaucoup au tortillement d'un serpent sur lequel on a marché.

Pour colorer les lamelles, on se servait le plus souvent de la coloration à l'argent de Fontana (fig. 1). Bien que par ce procédé les spirochètes perdissent de leur aspect naturel, ce moyen valait mieux que la méthode « Tuche de Burri », qui rendait beaucoup de spirochètes indistincts ou que la méthode de Giemsa, qui ne les colore que très faiblement. Plus tard j'employai la modification suivante de la technique de Fontana : au lieu de laisser pendant longtemps la préparation dans la solution de tanin phéniqué, je versais le liquide sur la lame et je tenais

celle-ci pendant environ vingt secondes au-dessus d'une flamme (jusqu'à l'ébullition), après quoi l'imprégnation avec l'argent se manifestait aussi fortement qu'avec la méthode originale.

En se servant de la méthode de Levaditi on pouvait colorer les spirochètes dans les tissus de la région périnéale. Ces spirochètes sont, sous tous les rapports, absolument semblables au *Treponema pallidum* et ne se distinguent pas de celui-ci.

J'ai fait des expériences d'inoculation pour en comparer les résultats avec ceux de Uhlenhuth et Mulzer; les résultats préliminaires de ces expériences peuvent être communiqués ici :

1° LA SCARIFICATION DE LA RÉGION PÉRINÉALE avec une émulsion de matériel contenant des spirochètes. (pièce de tissu sous la croûte) donnait dans tous les cas des résultats positifs.

L'incubation la plus courte était de onze jours, le plus souvent pourtant les spirochètes se montraient après trois ou quatre semaines. Il ne se formait pas d'ulcération à bords indurés. Les endroits enflammés se montraient en général comme des excoriations sans autre signe d'inflammation qu'un peu de rougeur sans enflure. Les excoriations étaient le plus souvent humides, situées surtout dans les plis à côté de la vulve, elles se couvraient de pseudo-membranes d'une nuance jaune. Lorsque la vulve (muqueuse ou peau) était le siège du mal, on constatait de la rougeur et une enflure assez forte. Dans les cas invétérés l'aspect était semblable à celui des lésions des lapins à maladie spontanée. Dans un seul cas une guérison se produisit après quelques semaines.

2° L'INOCULATION PAR SCARIFICATION DE LA PEAU DORSALE avec le même matériel que celui employé dans les expériences précédentes était suivie dans quatre cas sur six d'un résultat positif. L'incubation la plus courte fut d'un mois, la plus longue de deux mois. Dans tous les cas positifs les lésions furent superficielles (ayant tout au plus la grandeur d'une pièce de 50 centimes), pas trop profondes, peu saillantes, couvertes de petites croûtes blanches quelquefois foncées, le plus souvent détachées et contenant beaucoup de spirochètes.

3° L'INJECTION SOUS-CUTANÉE DANS LA PAUPIÈRE SUPÉRIEURE du même virus que celui de la première expérience produisit des ulcères sur la paupière supérieure après une incubation de cinq à huit semaines. Les ulcères étaient plus ou moins en relief, avaient la grandeur d'un grain de plomb, ils se couvraient d'abord d'écailles blanches, plus tard de croûtes plus foncées. Sous les croûtes existait une surface humide d'un rouge clair, dans laquelle on trouvait beaucoup de spirochètes.

4° L'INOCULATION INTRA-OCULAIRE a fourni également quelques résultats positifs. Dans une expérience avec le matériel mis en

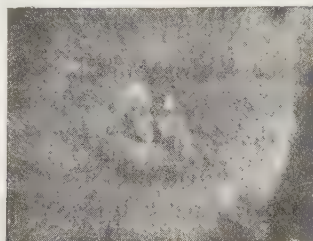


FIG. 2. — La région périnéale d'une lapine atteinte de la spirochètose spontanée.

œuvre dans les cas rapportés au paragraphe 1, 0,5 c.c. de l'émulsion fut injectée dans la chambre antérieure des deux yeux.

L'un des deux yeux, après trois mois, ne montrait aucune réaction. A l'autre œil, qui lui-même restait en apparence absolument normal, apparaissaient après deux mois des ulcères sur la paupière supérieure dans lesquels il y avait des spirochètes. Après l'introduction dans la chambre antérieure de quelques lapins de petits fragments de tissu périnéal provenant d'un des lapins achetés, on pouvait constater au bout d'une incubation de quarante et un à quarante-trois jours une kératite avec spirochètes dans le produit du raclage superficiel de la cornée.

Dans quelques cas on ne trouva pas de spirochètes dans le raclage superficiel de la cornée après inoculation dans la chambre antérieure de l'œil ou après introduction dans celle-ci de

fragments de tissu, mais il survenait après huit semaines des ulcères sur la paupière supérieure, semblables à ceux décrits plus haut. Dans un seul cas les ulcères palpébraux furent accompagnés d'une hyperplasie de la conjonctive sclérale, dans laquelle existaient des spirochètes qui furent employés pour des inoculations.

5° L'INOCULATION INTRATESTICULAIRE donna dans trois cas après huit semaines des érosions sur le scrotum ayant l'aspect de celles décrites sur le dos (voir paragraphe 2); elles contenaient des spirochètes. Il faut encore signaler l'apparition dans le scrotum d'une tumeur de la grosseur d'un petit pois qui n'adhérait ni à la peau, ni au testicule; la macération de ce nodule montrait des spirochètes innombrables.

6° INJECTIONS INTRA VEINEUSES. Une émulsion filtrée, contenant des spirochètes, injectée dans la veine ne fut suivie jusqu'ici d'aucun résultat positif.

Quelques animaux moururent d'autres infections après l'injection intraveineuse; chez d'autres l'incubation est encore trop récente pour pouvoir en tirer des conséquences.

7° UNE INFECTION GÉNÉRALE fut constatée (dix semaines après l'inoculation intra-oculaire [Sp. + après six semaines] et après deux semaines, à la suite de l'inoculation intratesticulaire); elle se traduisit par des ulcérations sur la peau du dos, à la base de l'oreille, à la région du nez et de l'œil. Le lapin restait en bonne santé.

8° UNE INFECTION SPONTANÉE a pu être constatée chez une lapine qui avait vécu deux mois avec les animaux achetés.

Arzt et Kerl ont déjà constaté en 1914 la présence de cette maladie des parties génitales et ont mentionné l'identité du spirochète avec le *Treponema pallidum*.

Dans le *Wiener klin. Wochenschr.*, 1914, n° 29, ils ont publié le résultat de leurs recherches ultérieures sur 800 lapins, sur lesquels ils ne trouvèrent pas moins de 26,9 p. 100 d'infectés. Ils transmirent la maladie seulement par scarification de la région périnéale. Plus tard Arzt constatait ensuite la maladie chez des lapins d'Innsbrück (*Dermatol. Zeitschr.*, t. XXIX, f. 2, 1920).



Sans connaître cette littérature Jacobsthal décrit (*Dermatol. Wochenschr. Leipzig*, t. 71, n° 33) en 1920 une maladie pareille et ne put provoquer une spirochètose locale que par scarification de la région de la vulve. Et enfin les plus récentes publications de Arzt et Kerl dans le *Dermatol. Wochenschr.*, n° 52, 1920, et de Schereschewky dans le *Berl. klin. Wochenschr.*, n° 48, 1920, ne donnent guère de renseignements éclaircissant le problème de l'identité de ce spirochète et du *Treponema pallidum*.

En comparant les résultats de ces recherches avec ceux obtenus avec le *Treponema pallidum*, il faut conclure que le spirochète trouvé sur ces lapins est absolument identique avec le *Treponema pallidum* ou en tout cas qu'il en est très rapproché.

La preuve absolue qu'on a ici affaire à une syphilis spontanée du lapin ne sera jamais donnée par des expériences, pas même si elles étaient positives sur les singes (ces expériences sont déjà commencées), puisqu'il manquerait le dernier chaînon de la recherche, l'infection de l'homme.

D'après ces expériences, les recherches expérimentales sur la syphilis poursuivies sur le lapin deviennent douteuses parce qu'on ne peut plus se fier à elles, tant que l'identité du spirochète n'est pas établie. Et encore après avoir constaté son identité, il restera très douteux que l'on puisse se servir du lapin comme animal d'épreuve pour la syphilis. On ne pourrait le faire qu'après avoir soumis les animaux pendant deux ou trois mois à une observation soigneuse avant de les utiliser pour des expériences.

D'ailleurs on risque d'inoculer avec le virus syphilitique un animal soi-disant sain, mais souffrant de spirochètose spontanée et latente qui se traduira plus tard par des ulcères non syphilitiques sur lesquels on croira prélever un virus syphilitique. Il peut encore arriver que l'on tire de fausses conséquences concernant l'incubation, etc., quand ce spirochète se manifestant spontanément paraît être plus tard un *Treponema pallidum*.

(Travail de l'Institut des maladies parasitaires et infectieuses,  
professeur : Dr L. DE BLIECK,  
et de la Clinique des petits animaux domestiques,  
professeur : Dr H. JAKOB, de l'Académie vétérinaire d'Utrecht.)

# L'AGALAXIE CONTAGIEUSE DE LA BREBIS ET DE LA CHÈVRE

ÉTUDE EXPÉRIMENTALE (*suite*)

par H. CARRÉ.

Mes recherches sur l'agalaxie ayant été interrompues de la façon la plus radicale en 1914 et ne conservant guère l'espoir d'avoir jamais la possibilité de les reprendre et de les continuer, je donne, dans ce court exposé, ce qu'il m'a été possible de constater, depuis la publication de mon premier mémoire (*Annales de l'Institut Pasteur*, décembre 1912) jusqu'en 1914.

## Persistence du virus dans la mamelle.

Bien que j'aie déjà attiré l'attention sur ce point particulier, en contradiction avec les affirmations de certains auteurs, je crois utile d'y insister à nouveau, car cette persistance de la virulence du liquide mammaire a une grande importance étiologique.

En effet, cette pérennité n'est pas un fait exceptionnel, le nombre d'animaux sur lequel j'ai opéré, au laboratoire, est forcément limité, mais la constance des résultats obtenus ne laisse aucun doute sur le danger réel que présentent ces porteurs-virus. D'autant plus que beaucoup de ces animaux, au bout de quelques mois, reprennent un embonpoint assez satisfaisant et que rien, dans leur aspect extérieur, n'attire l'attention sur eux.

Le 9 octobre 1912, j'injecte dans la mamelle de quatre chèvres quelques gouttes de virus agalaxique. Une d'elles meurt le 29 octobre d'agalaxie aiguë ; une autre meurt cachectique le 3 mars 1913.

Les deux autres, après un amaigrissement et des boiteries de longue durée, se remettent complètement : elles sont gaies, vives, avec un poil bien luisant : leur mamelle ne sécrète plus, fin mars 1913, que quelques gouttes de sérosité louche.

Le 27 mars, une chèvre 702 reçoit dans le trayon droit 1/1.000 de cent. cube de cette sérosité : le 6 avril, le quartier inoculé est volumineux, chaud, tendu, et fournit à la mulsion un liquide séreux louche avec grumeaux caractéristiques.

Le 31 mars, une chèvre 704 reçoit dans le trayon droit 20 cent. cubes de filtrat, sur bougie Chamberland L1, de la même sérosité : le 7 avril, le quartier inoculé fournit un liquide louche avec tortillons puriformes.

Ainsi, plus de six mois après le début de l'infection, le liquide mammaire s'est encore montré virulent.

### Dissémination du virus.

J'ai déjà fait voir comment, bien que le virus agalaxique cultive dans des organes clos (articulations, œil, mamelle), il pouvait être répandu à l'extérieur par les larmes s'écoulant de l'œil malade, même sans perforation de cet organe.

Il m'a été permis de constater un autre mode de dissémination. Si l'on abandonne une mamelle infectée sans la vider de son contenu, le sinus se remplit du liquide spécial qui a remplacé le lait normal, l'organe est parfois fortement distendu.

Par le fait de cette distension continue, le sphincter du trayon semble perdre sa vigueur constrictive : la moindre pression de la main fait sourdre très facilement une certaine quantité de liquide.

L'effort de la main n'est même pas nécessaire : le liquide s'écoule également quand, l'animal étant couché, la cuisse supérieure vient faire pression sur la mamelle lésée.

Il y a là encore une cause très nette de dissémination du virus, aussi serait-il à recommander de traire à fond la mamelle infectée, de prendre les précautions nécessaires pour empêcher, pendant la traite, le liquide d'être projeté hors du vase destiné à le recueillir et de le stériliser par l'ébullition. Mais il est certainement plus économique d'éliminer radicalement du troupeau ces dangereux malades.

### La vaccination n'empêche pas l'infection directe de la mamelle.

Nocard a montré (*Société de Biologie*, 18 juillet 1891) que la bactériodie charbonneuse, injectée dans le sinus mammaire

d'une chèvre vaccinée contre le charbon, cultive indéfiniment et que le lait de chaque traite est virulent.

L'animal, protégé par la vaccination, résiste à l'infection générale, mais la bactériodie cultive dans la mamelle comme elle le ferait *in vitro*.

Ce fait, très remarquable au point de vue général, n'a aucune importance dans l'étiologie du charbon. J'ai voulu m'assurer s'il en était de même pour l'agalaxie. Ce point particulier avait en effet un certain intérêt. Il est des pays, en Italie notamment, où l'agalaxie sévit sur les brebis destinées à la production du lait et il est établi que l'infection de la mamelle, si facilement réalisable par l'inoculation expérimentale du virus par les divers modes d'inoculation, peut être provoquée directement par les mains des personnes chargées de la traite, passant sans précautions d'une mamelle infectée à une mamelle saine.

Le lait de ces brebis sert à la préparation de fromages : et il faut croire que la proportion de liquide altéré, qui n'a plus rien de commun avec le lait, est parfois assez grande puisque la pâte des fromages en est nettement modifiée.

Il fallait donc s'assurer que la vaccination, capable d'empêcher l'infection générale et les localisations oculaires et articulaires, à la suite de l'absorption du virus par les voies digestives, pouvait également enrayer l'infection directe de la mamelle.

Le 8 mars 1913, deux chèvres, 702 et 703, reçoivent, sous la peau, un mélange de 1/10 de cent. cube de virus et de 5 cent. cubes de sérum antiagalaxique.

Le 27 mars, chacune d'elles reçoit, ainsi qu'une chèvre 703, témoin, 1/1.000 de cent. cube de virus dans le trayon droit. Le 2 avril, ces trois chèvres, vaccinées et témoins, présentent de la crépitation caractéristique du trayon inoculé et fournissent du lait altéré.

La vaccination simple (séro-vaccination) est donc insuffisante pour empêcher l'infection de la mamelle par l'introduction directe du virus dans cet organe. C'est vraisemblablement cette particularité qui permet d'expliquer l'échec total d'une grosse expérience de vaccination réalisée sous la direction de M. Bisanti, inspecteur de la Santé publique à Rome, sur plusieurs centaines de brebis en pleine lactation de la campagne romaine. La séro-vaccination (5 cent. cubes de sérum mélangée à 1/5 de cent. cube de virus) se montre inoffensive, mais n'empêche nullement l'apparition de l'agalaxie.



Ces brebis fournissaient du lait et la traite en était effectuée sans aucune précaution contre l'infection par la main des trayons.

Nous avons cherché à procurer une immunité plus solide en inoculant d'abord le séro-vaccin, puis une forte dose de virus seul.

Le 5 avril 1913, on injecte sous la peau d'une chèvre 712  $\frac{1}{10}$  de cent. cube de virus sensibilisé : une autre chèvre 715 reçoit  $\frac{1}{10}$  de virus mélangé à 5 cent. cubes de sérum.

Le 25 avril, chacune de ces chèvres reçoit sous la peau  $\frac{1}{2}$  cent. cube de virus, dose énorme : les deux chèvres supportent parfaitement cette inoculation, elles étaient solidement immunisées.

Le 20 mai, on leur injecte dans le trayon gauche  $\frac{1}{2}$  cent. cube de virus. Dès le 25 mai les trayons inoculés sont infectés.

L'immunité renforcée paraît donc, elle aussi, incapable de protéger la mamelle contre l'infection directe.

Poussant encore plus avant nos investigations dans cet ordre d'idée nous avons injecté, le 18 mars 1914, toutes nos femelles (7), destinées à la production du sérum antiagalaxique et qui avaient reçu des doses élevées de virus, dans la mamelle en pleine lactation.

Cette fois le résultat fut très net, la mamelle se montra réfractaire ; examiné pendant un mois le lait ne subit aucune modification.

L'immunité de la mamelle semble donc ne pouvoir être obtenue qu'au prix d'une imprégnation prolongée de l'organisme par des doses considérables de virus, telles que peuvent en recevoir les animaux producteurs de sérum.

Une solution pratique ne paraît guère réalisable dans ces conditions, à moins de vacciner spécialement la mamelle par l'injection de sérum virus dans le trayon. C'est une expérience qui mériterait d'être réalisée.

### Modification de la virulence.

Nous n'avons pas constaté de changements appréciables dans l'activité du virus agalaxique.

Le même virus, pendant un an, à des intervalles très rapprochés, fut inoculé de mamelle à mamelle chez des chèvres. L'infection de la mamelle fut réalisée chez tous ces animaux

sans aucune exception avec des doses minimales 1/100, 1/200, 1/1.000 de cent. cube; mais les localisations oculaires ou artérielles ne furent ni plus nombreuses ni plus graves, la mortalité ne fut pas plus élevée, l'amaigrissement consécutif ne fut pas plus prononcé dans les derniers lots que dans les premiers.

La période d'incubation ne fut raccourcie en rien.

### Vaccination par virus sensibilisé.

La sensibilisation des virus filtrables se heurtait à de grandes difficultés techniques : on connaît la façon très originale par laquelle Bridré et Boquet ont pu obtenir le virus claveleux sensibilisé et les résultats véritablement splendides qu'ils en ont tirés en pratique.

Il était indiqué de rechercher si la méthode pouvait s'appliquer au virus agalaxique.

Le 26 novembre 1913, on mélange 10 cent. cubes de liquide mammaire agalaxique, préalablement débarrassé de ses grumeaux par une centrifugation peu prolongée (trois minutes à 1.500 tours), avec 10 cent. cubes de sérum antiagalaxique : on place le mélange pendant un quart d'heure dans l'agitateur de Jousset, puis on l'abandonne à la glacière jusqu'au 29 novembre.

Le 29 novembre, le mélange est centrifugé pendant deux minutes à 3.500 tours : il se forme un culot au fond du tube : le liquide surnageant est rejeté, puis le culot est remis en émulsion dans 20 cent. cubes de solution physiologique.

Un agneau 691 reçoit sous la peau de l'épaule 1 cent. cube de l'émulsion : un agneau 692 en reçoit 2 cent. cubes.

On doit admettre que la totalité des éléments virulents n'a pas été centrifugée et que le culot ne représente, en réalité, qu'une partie du virus, mais la dose reçue par chaque agneau, si le virus n'avait pas été sensibilisé, était de beaucoup suffisante pour l'infection.

L'inoculation ne fut suivie d'aucun symptôme quelconque d'agalaxie.

Le 16 décembre, ces deux agneaux et un témoin agneau 695 reçoivent chacun dans le muscle de la cuisse 1 cent. cube de lait agalaxique.

Le 2 janvier, le témoin présente une kératite intense de l'œil gauche ; il est très amaigri, les traitements continuent à se bien porter et ne présentent rien d'anormal dans la suite.

Il semble donc que le virus sensibilisé soit susceptible d'être utilisé avantageusement chez le mouton.

Connaissant la grande sensibilité des chèvres au virus agalaxique, nous avons renouvelé l'expérience sur 4 de ces animaux en utilisant des doses plus faibles.

Le 18 décembre 1913, 10 cent. cubes de liquide mammaire agalaxique, centrifugés, sont mélangés à 50 cent. cubes de sérum, le mélange est agité pendant un quart d'heure, puis déposé à la glacière jusqu'au 21 décembre.

Le 21 décembre, le mélange est centrifugé à 3.500 tours pendant cinq minutes : le culot est remis en suspension dans 10 cent. cubes de solution physiologique.

Chaque chèvre reçoit sous la peau 1/10 de cent. cube de l'émulsion.

Toutes les quatre présentent dans la suite une mammite agalaxique.

Ainsi une dose de virus sensibilisé environ dix fois moindre que celle qui est bien supportée par un agneau non seulement ne procure pas l'immunité à la chèvre, mais provoque chez elle l'apparition de la maladie typique.

### Inoculation à la vache.

Le 31 janvier 1913, une vache reçoit dans le trayon antérieur droit 10 cent. cubes de liquide mammaire agalaxique d'une chèvre infectée depuis le 17 novembre 1912. Le 6 février, le trayon, ni chaud ni sensible, donne aux doigts qui le compriment une crépitation identique à celle que l'on constate sur les chèvres agalaxiques.

Le liquide obtenu par la mulsion est jaune, consistant, grumelleux, avec de la sérosité louche et un peu teintée par du sang. Le 14, le trayon donne des tortillons jaunâtres, sans sérosité. Le centre de la cornée gauche montre une plaque de kératite d'un centimètre de diamètre. Le 18, la kératite n'a pas augmenté : le trayon fournit 150 cent. cubes de matière jaunâtre en tortillons, sans sérosité.

Le 26, la lésion oculaire est en voie de régression. L'animal ayant dû quitter le laboratoire, nous n'avons pu le suivre plus longtemps.

Des expériences de vaccination sur un grand nombre de chèvres avaient été entreprises en Suisse, en 1914, pour l'Office vétérinaire du département fédéral de l'économie publique. Une lettre officielle du 8 mai 1915 m'informait qu'en raison de la mobilisation des vétérinaires qui avaient procédé aux inoculations, aucun renseignement ne pouvait m'être fourni sur les résultats obtenus.

**RECHERCHES SUR LE RÔLE DE LA GLOBULINE  
DANS LA RÉACTION DE WASSERMANN,  
AVEC UNE CONTRIBUTION A LA TECHNIQUE DE LA DIALYSE  
ET A L'EXÉCUTION DU WASSERMANN (1)**

par G. KAPSENBERG, de Leyde, à présent Groningue (Pays-Bas).

Ce mémoire se compose de trois parties qui, bien que dépendantes l'une de l'autre, constituent cependant chacune un tout distinct.

**A. — SUR UNE TECHNIQUE SPÉCIALE DE DIALYSE**

Pour les expériences, dont le compte rendu des résultats sera mentionné dans la troisième partie de ce mémoire, j'ai dû faire un usage détaillé de la dialyse.

Il m'a paru d'emblée nécessaire de me servir d'une technique de dialyse, offrant les avantages suivants : *sûreté* (les colloïdes étant retenus avec certitude, tandis que les cristalloïdes passent); *vitesse* (les cristalloïdes traversent la membrane le plus rapidement possible); *précision* (les quantités étant déterminées elle doit permettre d'obtenir sans erreur appréciable la totalité des substances, même lorsqu'on opère avec de petites quantités).

Je crois que j'ai réussi à satisfaire à ces exigences et comme le processus de la dialyse a ses explications sur tout le terrain de la science physique et biologique, il me semble utile de donner ici une courte description de la technique dont je me suis servi.

On se sert pour la dialyse de membranes d'origine animale et végétale.

Parmi les membranes d'origine animale, je rappelle la vessie

(1) Les expériences ont été exécutées dans le laboratoire de la polyclinique de dermatologie et vénérologie de l'Université de Leyde (Directeur, Dr J. H. P. van Kerckhoff, chargé de cours à l'Université).



du porc et celle nommée du poisson. La première était trop épaisse pour le but que je poursuivais; la deuxième est d'une manipulation incommode.

Parmi les membranes d'origine végétale, on se sert le plus souvent du papier parchemin, qui a pourtant le défaut de dialyser assez lentement et de se laisser ajuster difficilement autour d'un dialyseur cylindrique. Les capsules de parchemin de Schleicher et Schüll, telles qu'elles sont employées dans la réaction d'Abderhalden, ont à l'intérieur une surface trop rugueuse pour permettre de travailler quantitativement.

Metchnikoff (1), à l'instigation de Kroutizine, a employé une membrane qui se trouve dans la cavité intérieure des segments de roseaux (*Phragmitis communis*). Cette membrane a été examinée par Podbelsky (2) et surtout par Philippsen (3) et elle s'est montrée très favorable pour la dialyse. Seulement la technique n'est pas facile et cette membrane n'est pas utilisable à tous les cas. Les membranes de collodion, si bonnes qu'elles puissent être, sont d'une fabrication incommode et longue.

Or van Calcar (4) a attiré l'attention sur l'amnios de l'homme et des animaux, comme membrane très apte à la dialyse. Et, en effet, cette membrane mince, plissable, élastique, apparaît immédiatement comme idéale. Seulement elle se montrait impropre pour mes expériences, parce qu'elle laissait passer les substances albuminoïdes. Cette particularité est bien connue de van Calcar, et il l'interprète d'une façon très ingénieuse, mais qui me paraît pourtant inexacte.

Suivant van Calcar, la globuline passe à cause de la réaction alcaline du sérum et l'albumine à cause des sels. En effet, aussitôt que la grande majorité des substances alcalines et des sels est extraite par la dialyse, la membrane ne laisse plus passer ni la globuline, ni l'albumine. Si séduisante que soit cette explication, je crois qu'elle n'est pas d'accord avec les faits. Pour ma part, j'attribue cette particularité des mem-

(1) Ces *Annales*, t. 1, 1887, p. 326.

(2) Ces *Annales*, t. 12, 1898, p. 431.

(3) *Beiträge (de Hofmeister) zur chem. Phys. und. Path.*, 1902, p. 80.

(4) *Dialyse, Eiweisschemie und Immunität*. Leyde. S. C. van Doesburgh; Leipzig, Joh. Ambr. Barth., 1908.

branes tout simplement à leur porosité : les pores étant trop grands pour retenir la globuline et l'albumine.

Comment expliquer alors le fait que les substances albuminoïdes cessent bientôt de passer ?

La réponse est la suivante :

Par suite de l'extraction des sels, la globuline du sérum se précipite sur et dans la membrane et obstrue les pores. Conformément à cette interprétation, le passage de la globuline et de l'albumine me semble dépendre d'un défaut de la membrane et non pas de la réaction alcaline et des sels du sérum.

Pour prouver la justesse de cette explication, et surtout pour tâcher d'enlever aux membranes amniotiques leur perméabilité pour les albuminoïdes, j'ai recherché si les processus qui conduisent à un rétrécissement du tissu conjonctif ne pourraient pas amener une obturation des pores. Pourtant, les méthodes usuelles de fixation n'aboutirent pas au but poursuivi : l'alcool, la formaline, l'acide chromique laissaient la membrane perméable. Enfin, je suis parvenu au but visé par un procédé très facile, à savoir en chauffant les membranes dans de l'eau. Quand celle-ci a atteint une température de 70-80° on observe que la membrane, tout en exprimant un grand nombre de fines bulles d'air, se contracte très remarquablement.

La consistance est pourtant restée bonne, et il a été constaté que les substances albuminoïdes étaient alors retenues entièrement, sans que la perméabilité pour les sels eût notablement diminué. J'ai observé ensuite que les membranes résistaient très bien à une température de 100° pendant une minute (même davantage).

La technique précise dont je me sers pour préparer les membranes amniotiques est la suivante :

Aussitôt que possible, après que le placenta avec les membranes est arrivé au laboratoire, je sépare prudemment (avec les mains) l'amnios du chorion et du placenta. Le plus souvent cette opération ne présente aucune difficulté ; parfois on observe que l'amnios est déjà séparé du chorion par la nature ; il est très rare que l'on ne réussisse pas la séparation. Ensuite, on lave à l'eau courante pendant un à deux jours. Les membranes deviennent alors blanc bleuâtre ou gardent une teinte verdâtre.

Elles ont un côté lisse, celui de l'épithélium (1), et un côté plus ou moins gélatineux, celui qui a été en contact avec le chorion. On étale la membrane sur un verre plat (de préférence noirci), l'épithélium étant dirigé vers le bas. On peut alors enlever, en se servant du pouce, et sans difficulté, par des mouvements doux, mais un peu énergiques, la grande majorité de la masse gélatineuse un peu cohérente. La membrane est encore lavée pendant quelque temps et chauffée dans une quantité suffisante d'eau ordinaire. On a soin, au moyen par exemple de la partie close d'une éprouvette, de bien déployer la membrane avant et pendant que le rétrécissement s'établit. On attend que l'eau bouille distinctement, on la laisse bouillir pendant une minute, puis on retire la membrane de l'eau. On peut employer la membrane immédiatement ou la conserver.

La conservation peut se faire par deux procédés aussi efficaces; l'un consiste à plonger les membranes préparées dans la glycérine concentrée ou dans un liquide contenant au moins 60 cent. cubes de glycérine et 40 cent. cubes d'eau distillée. Dans l'autre procédé on suspend les membranes cuites, bien étalées devant une fenêtre, pour qu'elles sèchent rapidement au courant d'air. Elles sont ensuite gardées à sec dans un flacon bouché à l'émeri. Avant d'utiliser ces membranes on les fait tremper dans l'eau pour enlever la glycérine et dans le second cas pour leur rendre leur souplesse.

Elles ont une consistance satisfaisante; elles sont assez résistantes, élastiques, un peu comme le caoutchouc et se laissent très facilement appliquer autour d'un vase cylindrique pour en faire un dialyseur.

Pour opérer avec ces membranes, j'ai fait fabriquer des dialyseurs du modèle ci-contre (fig. 1). Ils ont trois petits crochets en verre, par lesquels on peut les suspendre au moyen de chaînettes (2) à un support approprié, portant aussi trois crochets. Les membranes étant très minces, il faut se

(1) VAN CALCAR pense que c'est l'épithélium de l'amnios qui devient gélatineux, ce qui n'est pas exact. Il suffit, pour s'en convaincre, de marquer par un petit nœud (comme pour la ligature d'un artère) le côté de la membrane qui a été en contact avec le liquide amniotique. Ce dernier reste lisse, tandis que l'autre est recouvert d'une couche plus ou moins gélatineuse.

(2) Les chaînettes sont indispensables pour permettre de placer commodément les dialyseurs dans un plan parfaitement horizontal, le verrier ne pouvant pas appliquer les crochets précisément dans le même plan.

garder de heurter le côté de la membrane (*b*) contre un objet dur (par exemple un autre dialyseur). Pour empêcher autant que possible un accident de ce genre, j'ai choisi la forme un peu ventrue. Un bon modèle, mais un peu compliqué, est celui avec six pointes protectrices, placées immédiatement au-dessus de la membrane (voir A). Les dialyseurs sont de différente grandeur, l'orifice inférieur a un diamètre d'environ 6 cm., 4 cm. ou 2 cm. 5. Le plus souvent je me suis servi des dialyseurs de 2 cm. 5 et de 4 centimètres. On ajuste la membrane, le côté de l'épithélium tourné vers l'intérieur du dialyseur; sa

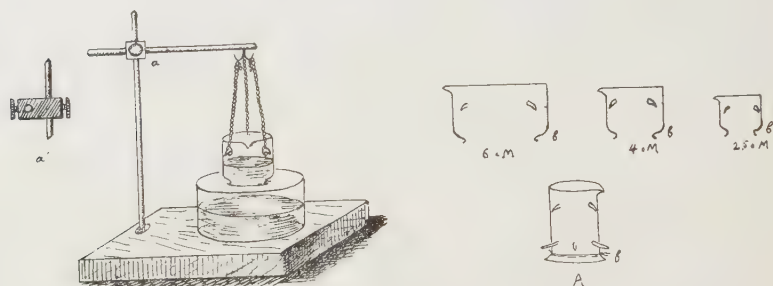


FIG. 1. — Appareils pour faire la dialyse avec les membranes amniotiques.

*A gauche* : support. La pièce métallique *a* (*a'* = *a* vue d'en haut) est trouée deux fois et munie de deux vis. Elle permet de donner aux dialyseurs les situations qu'ils doivent avoir. On peut ranger plusieurs supports à côté l'un de l'autre et plonger les dialyseurs dans un vase oblong, formant ainsi une véritable batterie de dialyseurs. Quelquefois il est commode de faire tourner le dialyseur d'un angle de 180° autour de *a*.

*A droite* : différents modèles de dialyseurs.

surface lisse permet d'opérer quantitativement. La fixation se pratique le mieux avec de la soie.

Avant de se servir de la membrane, il faut contrôler si elle est parfaitement étanche. Pour cela, on remplit le dialyseur d'eau et on le suspend en l'air. On sèche ensuite la membrane avec un morceau de papier filtre. Quand elle reste sèche pendant une heure, ou quand elle ne laisse transsuder après ce temps qu'une trace d'eau, on peut s'y fier entièrement.

On peut stériliser le dialyseur muni de sa membrane en le suspendant dans l'intérieur d'un autoclave et en chauffant pendant quinze minutes à la pression d'une demi-atmosphère, ou encore pendant une demi-heure dans la vapeur sans pression. La



membrane ainsi traitée garde sa propriété, elle est seulement un peu moins résistante.

Pour finir, quelques mots sur les qualités des membranes. L'épaisseur des membranes séchées est de 0 mm. 02 à 0 mm. 03, rarement 0 mm. 04 (1). On trouve la dernière dimension surtout à la partie, d'ailleurs bien utilisable, qui recouvre le placenta. L'endroit de l'amnios, qui a recouvert une artère, mesure quelquefois 0 mm. 05. Je rappelle que la membrane du *Phragmitis communis* a une épaisseur de 0 mm. 08 (Philippon) et que le papier parchemin le plus fin (ordinairement inutilisable) a une épaisseur de 0 mm. 04 à 0 mm. 05.

Les membranes se sont montrées imperméables pour les albuminoïdes du sérum (homme, bœuf), du liquide ascitique, de l'œuf de poule, du lait. Quelquefois avec le lait la membrane semble laisser passer après vingt-quatre heures une trace douteuse de substance albuminoïde; la membrane ayant été traversée, déjà en une heure, par des quantités notables de sels et de sucre, l'eau ambiante forme bientôt un bon milieu de culture, de sorte qu'elle est troublée à la température de la chambre par une flore bactérienne appréciable. Il est donc possible que cette albumine provienne des microbes. Or, en ajoutant quelques cristaux de thymol à l'eau distillée, je n'ai plus décelé le passage d'aucune substance albuminoïde.

En partie avec l'aide du professeur de Graaff, qui m'assistait pour les réactions chimiques et du D<sup>r</sup> Montagne, qui me fournissait les substances nécessaires (services pour lesquels je leur exprime ici ma profonde gratitude), j'ai recherché la perméabilité pour divers cristoalloïdes. Dans le dialyseur on place 5 c. c. d'une solution à 1 p. 100 (ou saturée si la substance ne se dissout pas suffisamment) et on l'entoure de 25 cent. cubes d'eau distillée. Après trois à quatre heures, on peut très distinctement montrer la présence des sels. Les substances suivantes ont été examinées :

NaCl, KI, KBr,  $\text{K}^+\text{AzO}_3^-$ ,  $(\text{AzH}^+)\text{SO}_4^-$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{K}^+\text{HPO}_4^-$ ,  $\text{K}^+\text{CO}_3^-$ ; des amino-acides comme le glycocolle, l'alanine, l'acide asparagine; peptone; glucose. Les membranes résistent très bien à l'action caustique d'une solution de  $\text{CuSO}_4$  à 10 p. 100. On peut

(1) L'épaisseur a été mesurée au moyen d'une vis micrométrique, les membranes sèches étant découpées le long des bords du dialyseur.

se faire une idée de la vitesse de la dialyse par le fait que dix minutes après avoir mis la solution physiologique dans le dialyseur, on peut montrer le sel marin dans l'eau distillée.

Je puis donc recommander la technique ci-dessus à tous ceux qui ont besoin de se servir de la dialyse.

Il reste à déterminer si la membrane se prête aussi à la réaction d'Abderhalden. Jusqu'ici j'ai seulement établi qu'une membrane, après un séjour de quinze jours dans l'eau distillée (entourée de glace), n'a laissé passer dans l'eau aucune substance albuminoïde ou donnant une réaction positive avec la ninhydrine.

## APPENDICE

L'*amnios* humain ne fournissant que des membranes de dimensions médiocres, on peut, pour dialyser de grandes masses, se servir avantageusement de l'*amnios* et surtout de l'allantoïde de la vache. On obtient alors des membranes d'une étendue très notable. Ces membranes se laissent isoler de la même façon que l'*amnios* humain. Elles me semblent un peu plus résistantes. La préparation en est cependant un peu plus incommode. La masse gélatineuse, volumineuse se laisse écarter avec plus de difficulté. Il est préférable de laisser les membranes plus de deux jours dans l'eau courante. Il faut cependant remarquer qu'on doit éviter la putréfaction, qui rend les membranes inutilisables. Comme l'*amnios* humain, elles laissent, à l'état cru, passer les albuminoïdes. Quand on les cuit, elles présentent les mêmes qualités que celles que j'ai décrites à propos des membranes humaines. L'épaisseur est la même.

### B. — SUR UNE TECHNIQUE SPÉCIALE POUR L'EXÉCUTION DE LA RÉACTION DE WASSERMANN

#### A. — L'Antigène (4).

L'instabilité des antigènes employés pour la réaction de Wassermann est bien connue. Or Boas, qui se sert d'un extrait

(1) *Nederl. Tijdschrift voor Geneeskunde*, 1913, t. 2, n° 13.

de cœur humain, le renouvelle chaque semaine. Bien que la précaution semble exagérée, c'est un fait indiscutable qu'un antigène, qui est un extrait alcoolique, a une tendance à s'altérer.

En considérant que les substances les plus altérables, comme les toxines, se gardent longtemps quand on les sèche, j'ai appliqué ce principe à l'antigène de la réaction de Wassermann. J'ai séché et pulvérisé le cœur humain et j'ai conservé cette poudre dans un flacon brun et fermé au moyen d'un bouchon muni d'un dessiccateur (chaux vive). Ensuite j'ai titré cette poudre et trouvé qu'une quantité de 30-40 milligrammes, épuisée par 5 cent. cubes d'alcool à 96 p. 100, donne un antigène excellent. Je l'ai comparé avec un extrait syphilitique, que j'avais reçu du laboratoire de Wassermann et avec un extrait de cœur de cobaye; il s'est montré aussi bon, sinon meilleur.

Voici quelques particularités de cet antigène :

1° FABRICATION DE LA POUDRE. — Le genre d'affection à laquelle le malade a succombé est indifférent; le mieux est cependant de choisir un cœur aussi normal que possible. On ne prend que le tissu musculaire, on le débarrasse du sang et de la sérosité en le pressant dans une serviette de toile et on le divise en petits morceaux (soit avec des ciseaux, soit avec le broyeur de Latapie). On l'étale alors sur des plaques de verre en couches très minces, que l'on sèche à l'air à une température de 37-50° (par exemple dans l'étuve, dans un stérilisateur, de préférence dans l'appareil de Faust-Heim). L'essentiel est d'éliminer l'eau aussi rapidement que possible afin d'éviter la putréfaction. On obtient des lames minces, cassantes, que l'on peut pulvériser dans un mortier, un peu difficilement sans doute, mais pourtant très finement. On garde la poudre à sec.

2° CONSERVATION. — Une poudre, fabriquée et conservée comme je viens de l'exposer, a été employée à plusieurs reprises pour la réaction de Wassermann, et elle s'est montrée cinq ans après sa fabrication d'aussi bonne qualité qu'au commencement. Il arrive quelquefois qu'une poudre excellente fournisse contre toute attente un extrait qui montre une action anticomplémentaire trop forte. Il suffit alors de sécher de nouveau la poudre pour faire disparaître ce défaut.

3° QUANTITÉS DE POUDRE ET D'ALCOOL POUR OBTENIR EXTEMPORANÉMENT UN BON EXTRAIT. — Ces quantités sont remarquablement constantes avec des cœurs même divers et se chiffrent toujours à 30-40 milligr. (ordinairement 40 milligr.) pour 5 cent. cubes d'alcool à 96 p. 100. (Depuis quelques mois, j'ai employé la poudre préparée de même avec un *cœur de bœuf*, et celle-ci s'est montrée aussi très utilisable dans les proportions mentionnées.)

4° FABRICATION DE L'EXTRAIT DE POUDRE. — On agite la poudre et l'alcool dans les proportions indiquées pendant dix minutes, dans un tube muni d'un bouchon en caoutchouc, soit au moyen d'un appareil, soit à la main. On filtre sur du papier filtre ordinaire et l'extrait est prêt à l'usage. Il n'y a aucun motif pour agiter plus longtemps, ce qui n'offrirait non plus aucun inconvénient.

*L'influence du temps* durant lequel on agite est bien démontrée dans l'expérience suivante :

EXPÉRIENCE. — 30 milligrammes de poudre sont agités dans 5 cent. cubes d'alcool pendant cinq, dix, quinze, vingt, et trente minutes. On fait la réaction de Wassermann avec ces extraits en laissant le complément et le sérum positif constants, mais en diminuant la quantité d'extrait (Pour les détails du Wassermann, je renvoie au passage y relatif) Dans tous les tubes sont placés 0 c. c. 2 de complément (dilué 1 : 10) et 0 c. c. 5 de sérum positif chauffé (dilué 1 : 5) A<sub>5</sub> = antigène obtenu en agitant cinq minutes, etc. Sa dilution est toujours 1 : 5.

Le résultat est indiqué dans le tableau n° 1.

TABLEAU I.

QUANTITÉS d'antigène diluées 1 : 5	RÉSULTATS DES WASSERMANN AVEC LES ANTIGÈNES				
	A <sub>5</sub>	A <sub>10</sub>	A <sub>15</sub>	A <sub>20</sub>	A <sub>30</sub>
c. c.					
0,3	H. nulle.	H. nulle.	H. nulle.	H. nulle.	H. nulle.
0,2	»	»	»	»	»
0,15	»	»	»	»	»
0,1	»	»	»	»	»
0,05	H. complète.	H. presque nulle.	H. presque nulle.	H. presque nulle.	H. presque nulle.
0,025	»	H. presque complète.	H. presque complète.	H. presque complète.	H. presque complète.
0,01	»	H. complète.	H. complète.	H. complète.	H. complète.



La majorité des substances actives passe donc dans l'alcool déjà en cinq minutes, mais la totalité en dix minutes.

De même qu'on peut garder l'extrait alcoolique, préparé selon la technique usuelle, de même on peut conserver l'extrait alcoolique obtenu par la technique que j'ai décrite. J'ai gardé un antigène pendant deux mois dans la glacière, sans qu'il ait perdu de qualité pendant ce laps de temps. L'idéal est pourtant de préparer chaque fois l'extrait extemporanément; et on peut le faire sans inconvénient, car j'ai démontré que les extraits de poudre, préparés à des moments divers, ont une composition suffisamment constante.

Le tableau II l'établit distinctement.

EXPÉRIENCE. — L'expérience est calquée sur la précédente.

J'ai dû employer 0 c. c. 3 de complément (dilué à 1/10°). Elle a eu lieu le 25 janvier 1918.

A<sub>1</sub> a été préparé le 21 décembre 1917. . . Agité dans un appareil.  
 A<sub>2</sub> — 28 — . . . —  
 A<sub>3</sub> — 23 janvier 1918 . . . —  
 A<sub>4</sub> — 25 — . . . Agité à la main.

TABEAU II.

QUANTITÉS d'antigène diluées 1 : 5	RÉSULTATS DES WASSERMANN AVEC LES ANTIGÈNES			
	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	A <sub>3</sub>	A <sub>4</sub>
c. c.	H. nulle.	H. nulle.	H. nulle.	H. nulle.
0,2	"	"	"	"
0,45	H. presque nulle.	H. presque nulle.	H. presque nulle.	H. nulle.
0,1	H. presque nulle.	H. presque nulle.	H. presque nulle.	H. nette.
0,05	H. presque complète.	H. presque complète.	H. presque complète.	H. nette.
0,025	H. complète.	H. complète.	H. complète.	H. complète.
0,01	"	"	"	"

Il est évident qu'il n'y a aucune différence entre A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> et A<sub>3</sub> et celle que montre A<sub>4</sub> est tellement minime qu'elle peut être négligée, sinon elle démontrerait la supériorité de l'agitation à la main.

5° L'ACTION HÉMOLYTIQUE DE L'EXTRAIT. — Elle est le plus souvent nulle, mais, quand elle se montre par hasard, elle ne gêne pas la réaction, parce qu'elle est annulée déjà par une petite quantité de sérum, par exemple par la quantité d'alexine qui est trop petite pour dissoudre les hématies sensibilisées. On supprime cette action hémolytique de la poudre en la séchant de nouveau.

6° ACTION ANTICOMPLÉMENTAIRE. — Elle est minima quand on s'en tient aux quantités indiquées.

### B. — Le système hémolytique.

Il se compose, en dehors de l'alexine, d'hématies de mouton, sensibilisées pendant deux heures avec quatre unités d'ambocepteur. Celui-ci est conservé, stérile, dans de petites ampoules dans la glacière. On peut le considérer comme restant constant.

Des recherches m'ont appris qu'une sensibilisation avec quatre unités suffit amplement pour fournir des hématies qui se dissolvent avec une quantité d'alexine minima. La sensibilisation se fait toujours à la glacière, afin de prévenir autant que possible l'agglutination éventuelle des hématies, qui pourrait entraver l'action du complément.

Les tableaux III et IV donnent les résultats de quelques expériences, qui confirment le bien-fondé de l'affirmation ci-dessus.

EXPÉRIENCE. — Titre de l'ambocepteur : 1 : 800 (1 unité =  $1/800^{\circ}$  de cent. cube de ce sérum) [1]. Durée de la sensibilisation : deux heures. Les hématies sont centrifugées et le sédiment est dilué avec du sérum physiologique de façon à obtenir une dilution de chromocytes à 5 p. 100.

Chaque tube contient 0 c. c. 5 d'hématies sensibilisées tenues en suspension et des quantités diverses de complément. Volume total : 2 c. c. 5.

(1) Pour prévenir un malentendu, je signalerai qu'il faut entendre, par une unité d'ambocepteur, la plus petite quantité d'un sérum hémolytique qui amène l'hémolyse complète de 1 cent. cube d'une dilution d'hématies à 5 p. 100 (c'est-à-dire 5 cent. cubes du *sédiment* des globules rouges lavées, dilués jusqu'à 100 cent. cubes), en présence de 1 cent. cube d'alexine de cobaye, diluée 1 : 10, le tout complété à un volume de 5 cent. cubes avec du liquide physiologique, après un séjour d'une heure au bain-marie à 37° ou de deux heures dans l'étuve à 37°.

TABLEAU III.

Résultat après un séjour d'une demi-heure dans le bain-marie.

Le liquide, qui est resté après que les hématies sensibilisées ont été centrifugées, ne donne plus d'hémolyse.

QUANTITÉS d'unités d'ambocepteur (titre 1 : 800)	QUANTITÉS DE COMPLÉMENT (DILUÉ 1 : 10) EN CENT. CUBES							
	0,5	0,4	0,3	0,2	0,15	0,1	0,05	0
1	H. complète.	H. complète.	H. complète.	H. presque compl.	H. nette	H. presque nulle.	H. nulle	H. nulle
2	"	"	"	H. complète.	H. presque compl.	H. presque nulle.	"	"
3	"	"	"	"	"	"	"	"
4	"	"	"	"	"	"	"	"
8	"	"	"	"	"	"	"	"

EXPÉRIENCE. — Titre de l'ambocepteur 1 : 3.200. Durée de la sensibilisation : une heure et demie. Pour le reste, comme dans l'expérience précédente.

TABLEAU IV.

Résultat après un séjour d'une demi-heure dans le bain-marie.

Le liquide, qui est resté après que les hématies sensibilisées ont été centrifugées, ne donne plus d'hémolyse.

QUANTITÉS d'unités d'ambocepteur (titre 1 : 3200)	QUANTITÉ DE COMPLÉMENT (DILUÉ 1 : 10) EN CENT. CUBES						
	0,3	0,2	0,15	0,1	0,05	0,025	0
1	H. nette.	H. nette	H. faible	H. presque nulle.	H. nulle.	H. nulle.	H. nulle.
2	H. presque compl.	H. presque compl.	H. presque compl.	H. nette.	H. presque nulle.	"	"
3	H. complète.	H. complète.	H. complète.	H. presque compl.	H. faible	"	"
4	"	"	"	"	"	"	"
8	"	"	"	"	"	"	"

Bain-marie pour l'exécution d'une réaction de Bordet-Gengou en général ou pour le Wassermann en particulier.

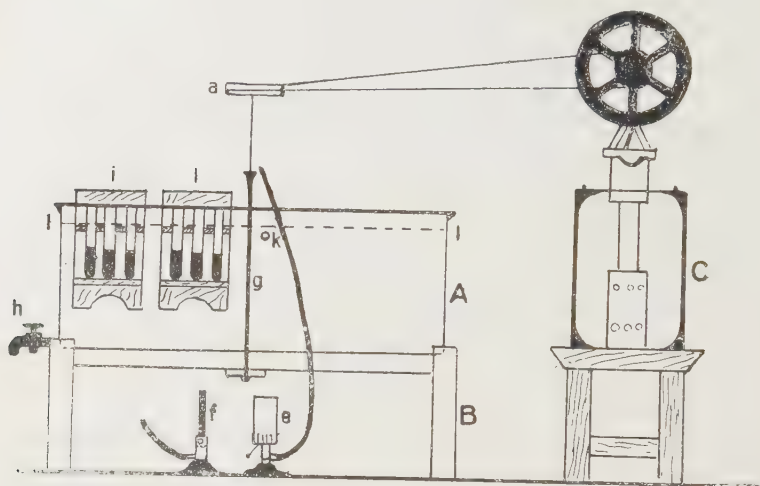


FIGURE 2.

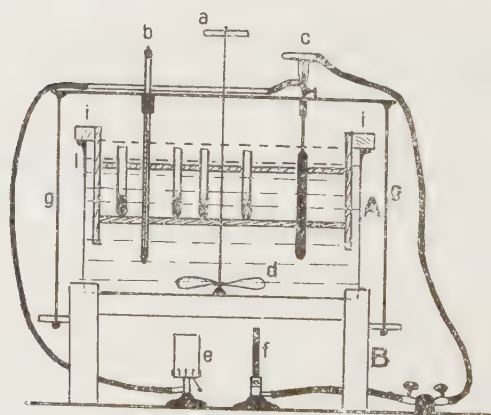


FIGURE 3.

Fig. 2 et 3. — A, bain-marie en fer galvanisé laqué (hauteur environ 20 centimètres, largeur et longueur d'après la nécessité); fig. 2, vue longitudinale; fig. 3, vue transversale (coupes demi-schématiques).

B, pied de fer.

C, petit moteur à air chaud : a, poulie pour transmettre l'action du moteur aux ailes (d, fig. 3) pour mettre l'eau en mouvement; g, monture pour fixer b (thermomètre), a et c (thermo-régulateur); e, bec d'Argan (pour la régulation); f, bec de Bunsen (pour chauffer l'eau au commencement); l, niveau de l'eau; i, porte-tubes; k, tube pour laisser s'écouler le superflu d'eau; h, le robinet.



Aussi quand on exécute ces expériences avec plus de 8 unités, par exemple 10, 12, 16, on ne réussit pas à diminuer davantage la quantité d'alexine qui est nécessaire pour obtenir l'hémolyse complète. La quantité minima du complément, donnant l'hémolyse complète *après un séjour d'une demi-heure dans le bain-marie à 37°*, s'atteint donc déjà avec 3-4 unités. L'emploi de plus d'unités n'est pas recommandable parce que alors le pouvoir agglutinant du sérum interfère désavantageusement. Il n'est pas non plus préférable de laisser les tubes plus longtemps dans le bain-marie ; la quantité minima du complément est par cela abaissée un peu, mais la fixation de la limite entre hémolyse complète et presque complète est rendue plus difficile.

Me basant sur ces expériences j'emploie pour le Wassermann, ainsi que pour toutes les réactions qui sont fondées sur le principe de Bordet-Gengou, le système hémolytique décrit.

### C. — Chauffage au bain-marie.

J'ai toujours été étonné de voir placer les tubes dans l'étuve.

Une réaction aussi précise que la déviation du complément exige également une température précise et constante. L'air dans l'étuve a une température différente suivant qu'on y place plus ou moins de tubes. Le chauffage des tubes se fait aussi très lentement.

J'emploie pour ces motifs, depuis des années déjà, un bain-marie, qui a le mérite de communiquer très rapidement aux tubes la température de l'eau ambiante.

La durée de la réaction est de ce fait diminuée de la moitié de celle qui est nécessaire dans l'étuve.

Je fais maintenant usage d'un bain-marie du modèle représenté dans les figures 2, 3 et 4.

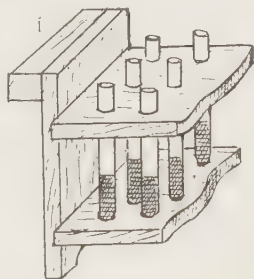


FIGURE 4.

Partie du porte-tubes qui montre la saillie *i*, laquelle doit reposer sur les bords du bain-marie.





quantité, donc 100 cent. cubes, de la sensibilisatrice antimouton, diluée de telle façon que chaque centimètre cube contienne quatre unités (ainsi un ambocepteur au titre 1 : 4.600 (1) sera dilué quatre cents fois et on prendra 100 cent. cubes de la solution). On peut naturellement ajouter aussi l'ambocepteur non dilué (dans l'exemple total 0 c. c. 25), mais il m'a paru que la dilution est favorable à la sensibilisation. On mêle soigneusement et on laisse sensibiliser à la glacière pendant deux heures, de préférence pas plus longtemps. Puis les hématies sont centrifugées et le liquide surnageant est éliminé. On prépare avec les hématies une suspension à 2,5 p. 100 et pas à 5 p. 100, afin de faciliter l'égalisation des volumes dans tous les tubes; dans l'exemple choisi on ajoutera donc 200 cent. cubes de liquide physiologique au sédiment des hématies sensibilisées.

L'avantage de cette façon d'agir est qu'on n'a pas à craindre l'influence entravante éventuelle du sérum du lapin, qui pourrait donner, surtout quand on a un ambocepteur avec un titre peu élevé, une réaction positive, et qu'on opère toujours dans les conditions les plus comparables.

#### *Epreuve préparatoire.*

Le titrage de l'ambocepteur ne se fait pas pour chaque réaction. Il suffit de l'exécuter seulement de temps à autre, parce que le sérum, conservé dans des ampoules à la glacière, garde longtemps son titre fixe.

On fait au contraire deux titrages du complément, l'un en l'absence et l'autre en présence de l'antigène, dont on prélève la quantité utilisée pour une réaction, c'est-à-dire toujours 0 c. c. 5 de la dilution 1 : 5.

On obtient par ces titrages deux valeurs du complément, qu'il faut distinguer, à savoir : 1° la quantité *minima* de l'alexine, qui suffit exactement pour dissoudre complètement 1 cent. cube de la suspension des hématies, en l'absence de l'antigène, désignée par *p*, et 2° la quantité *minima* de l'alexine, qui agit de même en *présence* de l'antigène, dénommé *q*.

(1) On peut, par ce procédé, employer aussi des sensibilisatrices dont le titre est plus bas, comme le démontre l'expérience avec l'ambocepteur du titre de 1 : 800.



Ordinairement  $q$  est plus grand que  $p$ , c'est-à-dire que l'antigène fixe lui-même une certaine quantité de l'alexine, notamment une quantité  $q - p$  cent. cubes. Rarement  $q = p$ , quand l'antigène n'agit pas anticomplémentairement.

L'exécution pratique apparaît le mieux dans le tableau V, lequel contient aussi un exemple de résultat. Pour plus de sûreté, on exécute la réaction avec deux antigènes, extraits de poudres différentes (1). Pour ne pas vanter la méthode, j'ai fait rentrer dans le tableau deux antigènes qui ne se comportent pas de la même façon. Mais ce n'est pas la règle. Quand on a un extrait, qui se montre un peu plus anticomplémentaire que l'autre, on peut éventuellement chercher à les égaliser en diminuant ou augmentant la quantité de poudre qu'on emploie pour l'extraction.

Je n'ai trouvé aucun avantage à pousser plus loin la graduation des quantités d'alexine que je ne l'ai fait dans l'épreuve préparatoire. Les petites fautes de technique, inévitables, pourraient influencer d'une façon trop sensible les résultats obtenus. Il est de rigueur absolue de ne constater l'hémolyse complète, que si le liquide contenu dans le tube ne montre pas le moindre trouble ou la moindre opalescence, provenant de quelques hématies non dissoutes.

### *La réaction proprement dite.*

L'idéal serait, dans la pratique de la réaction de Wassermann, de rechercher le pouvoir anticomplémentaire des sérums à examiner, ainsi que celui de l'antigène. Mais cela ne se fait pas et ce n'est pas nécessaire, parce que les sérums ne sont qu'exceptionnellement notablement anticomplémentaires aux doses usuelles. On peut d'ailleurs se fier au tube-contrôle contenant la dose double de sérum.

Or, le sérum ne fixant pas de complément en l'absence d'antigène, on obtient la réaction la plus sensible en le mêlant à l'antigène, puis ajoutant la quantité de complément  $q$  (obtenue dans l'épreuve préparatoire). Car dans ce tube il n'y a plus que la

(1) On peut naturellement aussi employer pour la méthode décrite des extraits préparés autrement.

quantité  $p$  de complément pouvant agir parce que l'antigène prend  $q - p$  (1). Un sérum, un peu positif, fixant donc seulement peu de complément, est alors reconnu avec certitude. Un sérum négatif, au contraire est découvert de même, parce que la quantité  $p$  suffit précisément pour donner l'hémolyse complète. Il y a cependant deux éventualités à envisager :

1° Le sérum peut agir anticomplémentairement à un degré très léger, sans qu'il se manifeste dans le tube-contrôle. Un sérum complètement négatif peut alors se montrer légèrement positif. C'est le cas surtout avec les sérums qui ne sont pas tout à fait frais.

2° Le sérum normal peut présenter à un certain degré la réaction de Wassermann, parce que celle-ci est liée à une particularité que possède vraisemblablement tout sérum et qui n'est que fortement augmentée dans un sérum syphilitique.

Les réactifs dans le tube mentionné (voir le tableau VI, les tubes 3, 3*a*, 3*b*, etc. et 5, 5*a*, 5*b*, etc.) sont par conséquent combinés dans des proportions qui peuvent rendre la réaction trop sensible.

Ils peuvent donner lieu à des résultats inexacts en ce sens qu'un sérum absolument négatif pourrait produire une réaction plus ou moins distinctement positive.

Pourtant *la pratique* a appris qu'on peut obtenir de bons résultats avec la combinaison décrite, surtout quand le sérum est frais, car le sérum diminue ordinairement le pouvoir anticomplémentaire de l'antigène. Un sérum négatif est alors démontré, comme il le faut, par l'hémolyse complète. Mais il n'est pas permis de s'y fier.

Pour compenser l'hypersensibilité dans ce tube, j'y joins toujours un second tube, contenant une quantité d'alexine qui est suffisante pour reconnaître avec certitude un sérum négatif et en même temps assez petite pour empêcher un sérum positif de passer inaperçu. Cette quantité est basée sur les résultats obtenus dans l'épreuve préparatoire et est calculée d'après les considérations suivantes :

Le sérum à examiner est contrôlé au point de vue de son

(1) Je suis convaincu qu'un tel calcul avec des substances colloïdes ne doit pas être en concordance parfaite avec les faits, mais la pratique m'a appris qu'on pouvait s'en contenter.

action anticomplémentaire en mettant une dose double en contact avec la quantité  $q$  de l'alexine, ce qui pratiquement revient à mettre la dose simple en présence d'une quantité  $1/2 q$  d'alexine. Or  $q$  le plus souvent étant plus petit que  $2 p$  (il doit l'être de préférence, comme je le montrerai bientôt)  $1/2 q$  est aussi plus petit que  $p$ . Ce qui revient à dire que le contrôle du sérum se fait par là d'une manière plus sensible que lorsqu'on met le sérum à dose simple en contact avec  $p$ .

Alors quand le tube de contrôle pour le sérum montre l'hémolyse complète, il n'en résulte qu'une quantité  $p$  du complément est restée libre. Le sérum dans la dose double *peut* donc (bien que cela ne soit pas nécessaire) avoir annulé une quantité de complément se montant à  $q - p$ , mais pas plus. Dans ce dernier cas on n'apercevrait pas l'hémolyse complète. La dose simple de sérum *peut* dans ce cas fixer de même une quantité  $1/2 (q - p)$  du complément. Il s'ensuit que dans le premier tube (dans le tableau VI les tubes 3, 3a, 3b, etc. et 5, 5a, 5b, etc.) la combinaison de sérum et d'antigène (faire abstraction d'une influence réciproque de ces réactifs) peut fixer spécifiquement la quantité suivante de complément :

$$q - p \text{ [par l'antigène]} + 1/2 (q - p) \text{ [par le sérum]} = 1 \ 1/2 q - 1 \ 1/2 p.$$

Cette quantité est égale à zéro lorsque  $q = p$ ; en d'autres termes, quand ni l'antigène, ni le sérum ne fixent de complément. Mais, l'épreuve préparatoire l'indique, le plus souvent  $q$  est  $> p$ . Dans ce cas  $1 \ 1/2 q - 1 \ 1/2 p$  peut être suffisant pour entraver l'hémolyse, à savoir lorsque  $q - (1 \ 1/2 q - 1 \ 1/2 p)$  est  $< p$ . Pour ce motif, j'ajoute dans le second tube, au lieu de la quantité  $q$ ,  $q + 1/2 p$  de complément. Les conditions dans ce tube étant les mêmes que dans le premier, la combinaison sérum-antigène peut absorber ici aussi la quantité  $1 \ 1/2 q - 1 \ 1/2 p$ , mais il reste alors dans ce tube :

$$q + 1/2 p - (1 \ 1/2 q - 1 \ 1/2 p) = 2 p - 1/2 q.$$

Quand  $q = p$ , ce tube contient  $1 \ 1/2 p$  de complément, quantité suffisante pour donner l'hémolyse complète en présence







d'un sérum négatif. Aussi quand ce sérum a une tendance à produire une réaction de Wassermann « normale », « pseudo-spécifique », une quantité de  $1/2 p$  peut être fixée, sans qu'il se montre entravement de l'hémolyse.

(Quand le sérum avec l'antigène fixe plus de  $1/2 p$ , la réaction ne peut plus être considérée comme normale.)

Un sérum, qui ne peut donner qu'une réaction faiblement positive, n'a à fixer avec l'antigène que la quantité  $p$  pour être reconnu, parce que le reste  $1/2 p$  du complément ne conduit pas à l'hémolyse complète. Tandis qu'un sérum qui réagit d'une façon nettement positive fixe très facilement  $1\ 1/2 p$  du complément.

Mais c'est une rareté que  $q = p$ , ordinairement  $q$  est  $> p$ . Or  $q$  ne doit pas être indéfiniment plus grand que  $p$ ; il y a des bornes, qui peuvent être fixées.

Nous avons démontré qu'il reste dans le second tube une quantité de complément se montant à  $2p - 1/2 q$ . Alors il va sans dire qu'il doit rester dans ce tube, quand les deux réactifs ont absorbé la quantité de complément que comporte leur action anticomplémentaire, la quantité  $p$ . S'il en reste moins, un sérum négatif se montrera plus ou moins positif. Il en résulte que :

$$2p - 1/2 q \text{ doit être égal ou plus grand que } p.$$

$$2p - 1/2 q \geq p$$

$$4p - q \geq 2p$$

$$2p - q \geq 0.$$

Il en résulte :  $q \leq 2p$ .

Ce qui revient à dire que l'antigène doit avoir une composition telle, que la quantité de complément, qui est en état de dissoudre complètement les hématies sensibilisées en sa présence, s'élève tout au plus au double de la quantité de complément qui produit l'hémolyse complète en son absence. Ou en d'autres termes : l'antigène à la dose usuelle doit tout au plus annuler une quantité de complément, qui se monte à la quantité minima de complément qui détermine par elle-même l'hémolyse complète.

Supposons que  $q$  soit égal à  $2p$ . Dans ce cas  $q + 1/2 p$  équi-



vaudra tout au plus à  $2\frac{1}{2}p$ . Ceci ne peut arriver quand la *combinaison* sérum-antigène n'a pas d'action anticomplémentaire. Or  $p$  est ordinairement 0 c. c. 2 et alors  $2\frac{1}{2}p = 0$  c. c. 5. Cette dernière quantité est celle qu'on emploie régulièrement dans le Wassermann original, et qui est très bien fixée par un sérum qui est nettement positif. La quantité de complément ajoutée dans le second tube n'est donc certainement pas trop grande et n'est pas non plus trop petite, lorsque  $q = p$ .

Les extraits préparés avec la poudre répondent à la condition :  $q \leq 2p$ . Pourtant il se présente parfois que l'antigène agisse un peu trop anticomplémentairement, de sorte que  $q$  est  $> 2p$ . C'est ce qui arrive quelquefois quand le système hémolytique est très sensible. Dans ce cas, il y a un certain désaccord entre l'action anticomplémentaire normale de l'antigène et l'action hémolytique anormale du complément. Alors, on peut mener la réaction à bonne fin en employant dans le second tube la quantité  $q + p$ , pourvu que  $q$  ne dépasse pas tout au plus  $3p$ .

En effet :  $q + p - (1\frac{1}{2}q - 1\frac{1}{2}p) \geq p$ .

$$2\frac{1}{2}p - \frac{1}{2}q \geq p$$

$$3p - q \geq 2p$$

$$3p - q \geq 0$$

$$q \leq 3p.$$

Quand  $q$  est  $> 3p$ , l'extrait est à rejeter.

Quelque compliqué que paraisse le calcul, l'exécution de la réaction est très simple. Mieux qu'une description, le tableau VI reproduisant aussi un exemple peut le prouver.

On a besoin de 0 c. c. 8 de sérum quand, comme dans l'exemple défavorable choisi, on a affaire à deux antigènes, qui sont anticomplémentaires à différents degrés. Comme il est facile de se procurer des antigènes qui se comportent de la même façon, il en résulte qu'une quantité usuelle de sérum de 0 c. c. 6 sera suffisante. Aussi peut-on se contenter de ne contrôler les sérums qu'avec  $q_1$  quand  $q_1 < q_2$ . Les tubes (2), (2a), (2b) sont ainsi facultatifs.

L'interprétation de la réaction peut se faire d'après le schéma indiqué au tableau VII.

TABLEAU VII.

Schéma pour l'interprétation de la réaction.

QUANTITÉS DE COMPLÉMENT AJOUTÉES DANS LES TUBES		INTERPRÉTATION
q	q + 1/2 p	
Résultat de la réaction.	Résultat de la réaction.	
Hémolyse nulle.	Hémolyse nulle.	Positif.
»	H. presque nulle.	»
»	H. partielle.	»
»	H. presque complète.	Faiblement positif.
»	H. complète.	Faiblement positif, mais douteux.
H. presque nulle.	H. presque nulle.	Positif.
»	H. partielle.	»
»	H. presque complète.	Faiblement positif.
»	H. complète.	Faiblement positif, douteux.
H. partielle.	H. partielle.	Faiblement positif.
»	H. presque complète.	Faiblement positif.
»	H. complète.	Faiblement positif, douteux.
H. presque complète.	H. presque complète.	Pas tout à fait négatif.
»	H. complète.	Négatif.
H. complète.	H. complète.	Négatif.

Les résultats pratiques de la méthode ont démontré avec certitude sa valeur pour le diagnostic de la syphilis.

Le Gérant : G. MASSON.